

Aus dem Institut für Virusdiagnostik
des Friedrich-Loeffler-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Insel Riems
Institutsleiter: Priv.-Doz. Dr. M. Beer

Angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. C. H. Grund

**Untersuchungen zu Infektionsverlauf und Ausbildung einer protektiven
Immunität im Haushuhn (*Gallus gallus*) nach *in ovo* Infektion mit einem
apathogenen aviären Paramyxovirusisolat vom Serotyp 1**

Inaugural Dissertation
zur
Erlangung der tiermedizinischen
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Regula Wäckerlin
aus Burgdorf

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Grund

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Goldberg

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Literatur	3
2.1	Taxonomie	3
2.2	Vorkommen und Ausbrüche	3
2.3	Virionenstruktur	5
2.4	Virusgenom	8
2.4.1	Genomorganisation	8
2.4.2	Genotypisierung	9
2.5	APMV 599	12
2.6	Pathotypisierung	14
2.7	Klinik, Pathologie und histologische Veränderungen	16
2.8	Virustropismus	18
2.9	Gesetzliche Regelung	21
2.10	Diagnostische Möglichkeiten	22
2.10.1	Serologischer Nachweis	22
2.10.2	Antigennachweis	23
2.10.3	Molekularbiologischer Nachweis und Differenzierung	23
2.11	Impfung	28
2.12	In-ovo Infektion und Impfungen	29
2.11	Brut und Immunitätsentwicklung	31
3.	Material und Methoden	34
3.1	Medien und Puffer	34
3.2	Virus	41
3.3	PCR	42
3.3.1	Aufbereitung des Organmaterials	42
3.3.2	Aufbereitung des Tupfermaterials	42
3.3.3	RNA-Aufbereitung mit Viral RNA Mini Kit	43

3.3.4	Analyse von PCR-Produkten im Agarosegel	43
3.3.5	RRT-PCR nach WISE et al (2004)	44
3.3.6	Entwicklung einer RRT-PCR auf dem NP-Proteingen	46
3.3.6.1	Primerauswahl	46
3.3.6.2	Sondenauswahl und –optimierung	48
3.3.6.3	NP-PCR	48
3.3.6.4	Auswertung und statistische Analyse der Ergebnisse	50
3.4	Tierversuch	51
3.4.1	Vorversuch	51
3.4.2	In ovo Infektion	51
3.4.3	Brut und Haltung	53
3.4.4	Belastungsinfektion	54
3.4.5	Probennahme	54
3.5	Serologie	57
3.5.1	Serumgewinnung	57
3.5.2	Hämagglutinationshemmungstest	57
3.5.3	ELISA	58
3.5.4	Western Blot	59
3.5.4.1	Aufreinigung von Virionen mittels Ultrazentrifugation	60
3.5.4.2	SDS-PAGE	60
3.5.4.3	Western Blot	61
3.6	Zelluläre Immunantwort	63

4. Ergebnisse 65

4.1	Entwicklung einer Real-Time RT- PCR	65
4.1.1	Primer- und Sondenauswahl	65
4.1.2	Bestimmung der Sensitivität	68
4.2	Tierversuch	70
4.2.1	Vorversuch	70
4.2.2	Versuch	71
4.2.2.1	Beimpfung mit APMV 599	71
4.2.2.2	Sentinelgruppe	72
4.2.2.3	Ungeimpfte Kontrollgruppe	73
4.2.2.4	Beimpfung mit APMV Clone 30	73
4.2.2.5	Klinik nach Challenge	74

4.2.3	Pathologie	78
4.2.3.1	Pathologie nach Schlupf – In ovo infizierte Versuchsgruppe und Sentinels	78
4.2.3.2	Pathologie nach Challenge	78
4.2.4	Gewichtsentwicklung	81
4.2.5	Virusnachweis und Organtropismus	82
4.2.5.1	Pre-challenge	82
4.2.5.2	Post-challenge	87
4.2.6	Ausscheidung und Übertragung	90
4.2.6.1	Ausscheidung vor Belastungsinfektion	90
4.2.6.2	Ausscheidung nach Belastungsinfektion	92
4.2.7	Serologie und Immunologie	93
4.2.7.1	Hämagglutinationshemmungstest	93
4.2.7.2	ELISA	95
4.2.7.3	Western Blot	98
4.2.7.4	Zelluläre Immunantwort	99
5.	Diskussion	101
5.1	Etablierung einer Real-Time RT- PCR	101
5.2	Klinik und Virustropismus	103
5.3	Ausscheidung	109
5.4	Humorale und zelluläre Immunantwort	112
5.5	Eignung als Impfstoff	117
6.	Zusammenfassung	119
7.	Summary	121
8.	Literaturverzeichnis	122
9.	Anhang	148
9.1	Tabellenverzeichnis	150
9.2	Abbildungsverzeichnis	152
9.3	Abkürzungen	153

10. Lebenslauf

11. Danksagung

1. Einleitung

Das aviäre Paramyxovirus vom Serotyp 1 (APMV-1) ist der Verursacher der Newcastle Disease, einer weltweit verbreiteten, hochkontagiösen und insbesondere bei Haushühnern und Puten mit hohen Verlusten einhergehenden Erkrankung. Aufgrund ihrer grossen wirtschaftlichen Bedeutung wird die Newcastle Disease bei der Organisation Internationale des Épizooties (O.I.E.) auf der Liste der anzeigepflichtigen Tierseuchen geführt. Die Bekämpfung basiert in Deutschland auf Massnahmen einer „*stamping out*“ Politik im Seuchenfall, als Prophylaxemassnahme ist eine Impfung für Hühner und Puten gesetzlich vorgeschrieben. Diese wird in Wirtschaftsgeflügelbeständen üblicherweise durch die Applikation eines schwachvirulenten Lebendvirusimpfstoffs über Spray- oder Trinkwasservakzinierung zwischen dem ersten und dem 14. Lebenstag umgesetzt, die anschliessend in regelmässigen Abständen über die gesamte Produktionsperiode aufgefrischt wird.

Zur frühzeitigen Immunisierung, die eine möglichst vollständige protektive Immunität sowie durch gezielte Applikation eine erhöhte Impfsicherheit und Verringerung der Kontamination mit versprühtem Lebendimpfstoff garantieren sollte wurden Bemühungen zur Entwicklung eines Impfstoffes im Ei unternommen.

Die klassischen Impfstämme LaSota und Hitchner B1 führen allerdings bei einer Applikation ins Hühnerei zum Tod der Embryonen (AHMAD & SHARMA, 1992; DILAVERIS et al, 2007; MAST et al, 2006). Deshalb wurden Ansätze entwickelt, bei denen chemisch attenuiertes Lebendvirus (AHMAD & SHARMA, 1992), inaktives Virus (STONE et al, 1997) oder Vektorvakzinen auf Grundlage rekombinanter Pocken-, Influenza- oder Adenoviren (PEROZO et al, 2008a; RAUTENSCHLEIN et al, 1999; STEEL et al, 2008) eingesetzt wurden. Aufgrund der Schädigung der Tiere durch das verwendete Virus, eines unvollständigen Impfschutzes oder der Notwendigkeit häufiger Reimmunisierung kam die in ovo Schutzimpfung für Newcastle Disease jedoch nicht zur Anwendung in der Wirtschaftsgeflügelproduktion. Ungeklärt ist, ob APMV-1 Stämme, die im Küken als apathogen einzustufen sind, nach in ovo infektion zu einem wirksamen Schutz führen, ohne eine Schädigung des Tieres zu induzieren.

Als möglicher Kandidat sollte in der vorliegenden Arbeit ein apathogenes APMV-1 Isolat aus einem Graupapageien (Stamm 599) getestet werden, das eine hohe Homologie zu dem bekannten Impfstamm Hitchner B1 aufweist. Der Stamm zeigte in

vorangegangenen Studien jedoch im Vergleich zu Hitchner B1 eine deutlich abgeschwächte Pathogenität im Hühnerei, welche zum Überleben infizierter Embryonen führte. Auch bei der gesetzlich vorgeschriebenen Untersuchung zur Ermittlung der Pathogenität, dem intracerebralen Pathogenitätsindex (ICPI) wurde ein Wert von 0 erzielt (GRUND et al, 2002).

Die durchgeführte Arbeit hatte das Ziel, den Stamm 599 hinsichtlich seiner Immunogenität nach in ovo Infektion zu untersuchen. Weiterhin sollten Aussagen zur Ausbreitung des Virus im Organismus getroffen werden. Diese Fragestellungen sollten im Tierexperiment durch in ovo Infektion von spf-Eiern mit dem aviären Paramyxovirusstamm 599 und der anschliessenden Überprüfung der Virusausbreitung, der Immunantwort und der protektiven Wirkung der Vakzination beantwortet werden. Die zu erwartenden Aussagen sollen einen Beitrag zum Verständnis des Infektionsverlaufs und der embryonalen Immunitätsentwicklung gegen aviäres Paramyxovirus vom Serotyp 1 nach in ovo Infektion leisten, die eine wichtige Komponente der Entwicklung einer in ovo Vakzine und somit einer frühzeitigen flächendeckenden Immunisierung darstellen.

2. Literatur

2.1 Taxonomie

Das aviäre Paramyxovirus wird der Ordnung der *Mononegavirales*, Familie *Paramyxoviridae*, Subfamilie *Paramyxovirinae* und dem Genus *Avulavirus* zugeordnet (ALEXANDER et al, 2000, 2001; DE LEEUW & PETERS, 1999). Die Einteilung innerhalb des Genus *Avulavirus* erfolgt anhand der Serotypisierung der viralen Oberflächenantigene in neun Serotypen (APMV-1 bis -9), von denen das aviäre Paramyxovirus des Serotyps 1 die grösste klinische und wirtschaftliche Bedeutung besitzt.

Das aviäre Paramyxovirus vom Serotyp 1 erlangte seine Bedeutung als Erreger der Newcastle Disease, die erstmals 1926 zeitgleich auf Java / Indonesien und in Newcastle-upon-Trent beschrieben wurde (KRANEVELD et al, 1926; DOYLE et al, 1927; ALEXANDER et al, 2001). Es wird allerdings vermutet, dass das Virus in seiner virulenten Form bereits vor der Erstbeschreibung kursierte, jedoch klinisch nicht von hochpathogenem aviären Influenzavirus zu unterscheiden war (ALEXANDER et al, 2001; LANCASTER et al, 1977).

2.2 Vorkommen und Ausbrüche

Das Newcastle Disease Virus zeichnet sich durch ein breites Wirtsspektrum aus, eine Empfänglichkeit von Vögeln aus 27 von 50 Ordnungen ist beschrieben (KALETA & BALDAUF, 1988), wobei sich unter den Wirtschaftsgeflügelsspezies die klinische Symptomatik bei Huhn (*Gallus gallus dom.*) und Pute (*Meleagris gallopavo*) am stärksten manifestieren (ALEXANDER, 1997).

Als Zoonoseerreger vermag das Newcastle Disease Virus beim Menschen nach Belastung mit hohen Virusmengen granulierende Konjunktivitiden auszulösen, wobei eine Replikation auf die Schleimhäute des Auges begrenzt ist (HALES & OSTLER, 1973; KNORR & WEBER, 1992, LIPPMANN, 1952).

Eine Ballung von Newcastle Disease Ausbrüchen ist auf den Kontinenten Afrika und Asien zu verzeichnen, wobei das Newcastle Disease Virus in einigen Ländern dieser Kontinente als endemisch gilt (Tab.1).

Aber auch aus Europa werden der O.I.E. regelmässig Newcastle Disease Ausbrüche gemeldet (Tab. 2), so dass auch in der Wirtschaftsgeflügelindustrie der Länder der Europäischen Gemeinschaft von einem beständigen Infektionsdruck auszugehen ist.

Tab 1 Anzahl der von Newcastle Disease Ausbrüchen betroffenen Länder weltweit in den Jahren 2005, 2006 und 2007 (Quelle: O.I.E. WAHID Disease Information Database)

Jahr	EU-Länder	Europa (nicht EU)	Nordamerika	Australien	Südamerika/ Karibik	Asien	Afrika/ Nahe Osten
2005	8	3	0	0	4	26	34
2006	8	3	0	0	6	27	30
2007	7	2	0	0	5	17	33

Tab 2 Von Newcastle Disease betroffenen europäische Länder in den Jahren 2005, 2006 und 2007 (Quelle: O.I.E. WAHID Disease Information Database)

Jahr	EU	Europa (nicht EU)
2005	Bulgarien Dänemark Frankreich Griechenland Slowakei Schweden Vereinigtes Königreich	Albanien Zypern Mazedonien
2006	Belgien Bulgarien Frankreich Italien Rumänien Schweden Slowakei Vereinigtes Königreich	Albanien Serbien Ukraine
2007	Bulgarien Tschechien Estland Griechenland Rumänien Schweden Slowakei	Albanien Serbien

Als Überträger und Verursacher eines Newcastle Disease Ausbruchs wird primär der Handel mit Lebendgeflügel und tierischen Produkten verantwortlich gemacht (ALEXANDER, 2001), aber auch viele Wildvogelspezies kommen als Überträger in Frage, insbesondere Spezies, die selbst wenig klinische Symptome zeigen. Auch Importvögel wurden wiederholt für Ausbrüche in Wirtschaftsgeflügelpopulationen verantwortlich gemacht (KINDE, 2005; PEARSON, 1975; SEAL, 1995). Bei Ausbrüchen in Australien wird auch Papageienvögeln eine Rolle als Überträger des Virus zugeschrieben (CROSS, 1991)

Weiterhin stehen Populationen wilden Wassergeflügels im Verdacht, aufgrund geringer klinischer Beeinträchtigung als Reservoir für Newcastle Disease Virus sowie schwächer virulentes aviäres Paramyxovirus zu dienen und durch Zugaktivitäten deren geographische Verbreitung zu fördern (GLASER, 1992; KUIKEN, 1998; KUIKEN, 1999; METEYER, 1997)

2.3 Virionenstruktur

Bei dem aviären Paramyxovirus handelt es sich um ein behülltes Virion von ca. 100 bis 500 nm Durchmesser und pleomorpher Gestalt. Auch eine filamentöse Struktur des Virus ist beschrieben (YUSOFF, 2001).

Das virale Genom transkribiert für sechs Proteine, Nukleoprotein (NP), Phosphoprotein (P), Matrixprotein (M), Fusionsprotein (F), Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) und die viruseigene Polymerase „large“- Protein (L), wobei P durch post-transkriptionales mRNA Editing für zwei weitere Proteine, V und W, kodiert (LAMB & KOLAKOFSKY, 1996; LAMB & PARKS, 2008; LOCKE et al, 2000; MEBATSION et al, 2001; MEBATSION et al, 2003; PEDERSEN et al, 2004; STEWARD et al, 1993).

Die Oberflächenproteine Fusionsprotein (F) und Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) sind in die virale Lipopolysaccharidmembran eingelagert, wo sie für die Bindung und den Eintritt des Virus in die Wirtszelle sowie die Antigenität im Wirtsorganismus verantwortlich sind. Beide Oberflächenproteine sind in der Lage, eine protektive Immunität zu bewirken (MEULEMANS, 1986; NAGY 1991). Sie geben der Virushülle ihre charakteristische, elektronenmikroskopisch sichtbare Struktur durch die Formation von Spikes. Das F-Protein wird als nicht funktionelles Precursor-Protein

(F₀) synthetisiert und durch zelluläre Proteasen in die beiden durch eine Disulfidbrücke verbundenen Teilproteine F₁ und F₂ gespalten (NAGAI, 1976; KLENK, 1980; PEEPLES, 1988; SALIH, 2000). Dies geschieht bei meso- und velogenen Stämmen mit Hilfe ubiquitärer Proteasen am Golgi Apparat, bei lentogenen Stämmen jedoch extrazellulär in Abhängigkeit von trypsinartigen Proteasen. Die Aminosäuresequenz über die F-Protein Spaltstelle, die von den Aminosäuren 112 bis 117 des F₀-Proteins reicht, gilt daher als indikativ für die Pathogenität des entsprechenden Stammes (COLLINS et al, 1993; O.I.E, 2008).

Anhand der Stämme Ulster und Queensland wurde ebenfalls nachgewiesen, dass auch das HN-Protein zunächst als Vorläuferprotein HN₀ vorliegt und der Aktivierung durch die proteolytische Abspaltung eines Glykopeptidrestes bedarf (GARTEN et al, 1980b). Die Bindung an die Zielzelle erfolgt rezeptorvermittelt und wird durch die Bindung des Hämagglutinin-Neuraminidase-Proteins an Sialinsäurestrukturen auf der Zelloberfläche vermittelt. Die genaue Rezeptorstruktur ist bislang ungeklärt, als Rezeptor diskutiert wird eine Vielzahl von Sialoglycoproteinen und membranständigen Polyglycosylceramiden, unter anderem konnte eine Bindung an HPLC-aufgereinigte Ganglioside nachgewiesen werden (FERREIRA et al, 2004). Auch eine Bindung an ein kurzkettiges synthetisches Peptid mit der Sequenz CTLTTKLYC, welches eine Inhibition der Bindung von NDV an seine Zielzellen bewirkt, ist beschrieben (CHIA et al, 2006). Die Bindung an die Oberfläche von Erythrozytenmembranen wird auch diagnostisch bei der Durchführung des Hämagglutinationshemmungstests sowie bei der Einteilung in die Serotypen 1 bis 9 und der Feindifferenzierung innerhalb des Serotyps 1 mit monoklonalen Antikörpern genutzt (RUSSELL & ALEXANDER, 1983).

Weiterhin besitzt das HN-Protein eine Neuraminidase- und Sialidasewirkung und nimmt eine unterstützende Funktion in der Vermittlung der Fusion mit der Zellmembran ein, die in der Fussdomäne des Proteins lokalisiert ist (COBALEDA et al, 2002; MORRISON et al, 1991). Das aminoternale Ende des HN-Proteins interagiert mit dem hydrophoben Matrix (M)-Protein, das der Lipidmembran im Inneren des Virions angelagert ist. Das M-Protein steht in direkter Interaktion mit dem Nukleoprotein und ist massgeblich für die Struktur des Virus verantwortlich. Dies lässt vermuten, dass eine der Funktionen des Matrixproteins auch die korrekte Verpackung des Nukleokapsids bei der Formation neuer Virionen ist sowie eine

zentrale Rolle beim korrekten Austritt aus der Zelle einnimmt (TAKIMOTO & PORTNER, 2004).

Das 489 Aminosäuren lange Nukleoprotein (NP) bildet gemeinsam mit der viralen RNA und dem Phosphoprotein (P) das 18 nm lange Nukleokapsid. Es formt einen Tubus von fischgrätenförmiger Gestalt, in den die virale RNA zum Schutz vor zelleigenen RNAsen eingelagert ist und dessen Windung 5,5 nm beträgt (LAMB et al, 2005). Am relativ stark konservierten aminoterminalen Ende wird die Bindung zur RNA vermittelt, weiterhin sind an diesem Ende die für die Struktur des Nukleokapsids verantwortlichen N-N Interaktionen lokalisiert (BUCHHOLZ et al, 1994; SEAL et al, 2002). Diese Region beinhaltet drei auf Aminosäureebene hochkonservierte Sequenzen zwischen den Aminosäuren 114-129, 258-357 und 362-375 (PHAM et al, 2004). Das für die Bindung des P-Proteins verantwortliche carboxyterminale Ende ab der Aminosäure 402 hingegen ist hochvariabel (BUCHHOLZ et al, 1994), es finden sich nur zwei konservierte Bereiche zwischen den Aminosäuren 444 bis 459. Auch die letzten acht Aminosäurereste des NP Proteins sind konserviert (PHAM et al, 2004). Die Bindung des Matrixproteins (M) sowie der Polymerase (L) erfolgt durch den variablen C-terminalen Anteil des NP-Proteins (CORONEL et al, 2001; NISHIO et al, 2000). Weiterhin ist das carboxyterminale Ende massgeblich für die Antigenität des NP-Proteins verantwortlich, es erlaubt durch seine Variabilität eine Differenzierung von Stämmen mittels monoklonaler Antikörper (PANSCHIN et al, 2000; SEAL et al, 2002). Chimärenexperimente zum Austausch des NP Proteins zwischen den Stämmen LaSota und Beaudette C mit Hilfe des reversen genetischen System bewirkten weder in vitro noch in vivo eine Veränderung der Virulenz, so dass angenommen wird, dass das NP Protein hinsichtlich dieser viralen Eigenschaft eine untergeordnete Rolle spielt (ROUT & SAMAL, 2008). Auch ein Austausch der NP und P Proteine gemeinsam ergab keine Virulenzsteigerung. Zusammen mit dem „large“ Protein (L) und dem Phosphoprotein (P) bilden NP-Protein und RNA den viralen Transkriptase Komplex. Das L-Protein fungiert als viruseigene Polymerase und spielt ebenfalls eine Rolle in der Virulenzsteigerung des Newcastle Disease Virus (ROUT & SAMAL, 2008).

2.4 Virusgenom

2.4.1 Genomorganisation

Das aviäre Paramyxovirus besitzt ein einzelsträngiges, negativ gerichtetes, unsegmentiertes RNA-Genom. Mit wenigen Ausnahmen haben Stämme der Genotypen I bis IV (Genotypisierung siehe Kap. 2.4.2) ein Genom von 15168 Basenpaaren Länge, wie dies auch bei den klassischen Impfstämmen LaSota und B1, die zum Genotyp II gehören, der Fall ist (KRISHNAMURTY & SAMAL, 1998; DE LEEUW & PEETERS, 1999; RÖMER-OBERDÖRFER et al, 1999). Im Gegensatz dazu weisen Stämme, die zu den Genotypen V bis IX gehören, eine Genomlänge von 15192 Basenpaare Länge auf (CZEGLEDI et al, 2006; HUANG et al, 2004), was durch eine Insertion von sechs Nukleotiden in der nichtkodierenden Region am 5'-Ende des NP-Proteingens zustande kommt.

Die Genomlänge der hauptsächlich aus Wassergeflügel isolierten Stämme der Klasse I beträgt 15198 Nukleotide, was durch eine Insertion von 12 Nukleotiden an Position 2381 der kodierenden Region des P-Gens zustande kommt (CZEGLEDI et al, 2006; SEAL et al, 2005).

Auf dem Genom sind linear wie in Abb. 1 gezeigt die kodierenden Gene der Struktur- und Nichtstrukturproteine in der Reihenfolge 3'- NP – P – M – F – HN – L -5' angeordnet, unterbrochen von Intergenregionen unterschiedlicher Länge (CHAMBERS, 1986; WILDE, 1986). Die kodierende Region wird flankiert von einer Leadersequenz am 3'- und einer Trailersequenz am 5'-Ende, die beide eine Länge von etwa 50 Nukleotiden haben (PEETERS, 2000; PHILLIPS, 1998; YUSOFF, 2001). Die Transkription erfolgt in mindestens sechs monocistronische mRNA-Moleküle sowie sechs bis sieben polycistronische Transkriptionsprodukte (TOYODA, 1987). Es erfolgt eine Polyadenylierung der generierten kodierenden mRNA am 3'-Ende. Die Transkriptionsprodukte der 3' *Leader*- und 5'-*Trailer*sequenz unterliegt hingegen nicht der Polyadenylierung (PEEPLES, 1988).

Die Synthese der mRNA erfolgt entlang eines Gradienten, wobei die Anteile der mRNA invers proportional zur Distanz vom 3'-Ende des viralen Genoms sind (LAMB & PARKS, 2008; LOMNICZI, 1971; COLLINS & BRATT, 1973). Das Transkriptionsprodukt des NP-Proteingens liegt also unter den kodierenden mRNA Molekülen in der höchsten Kopienzahl vor.

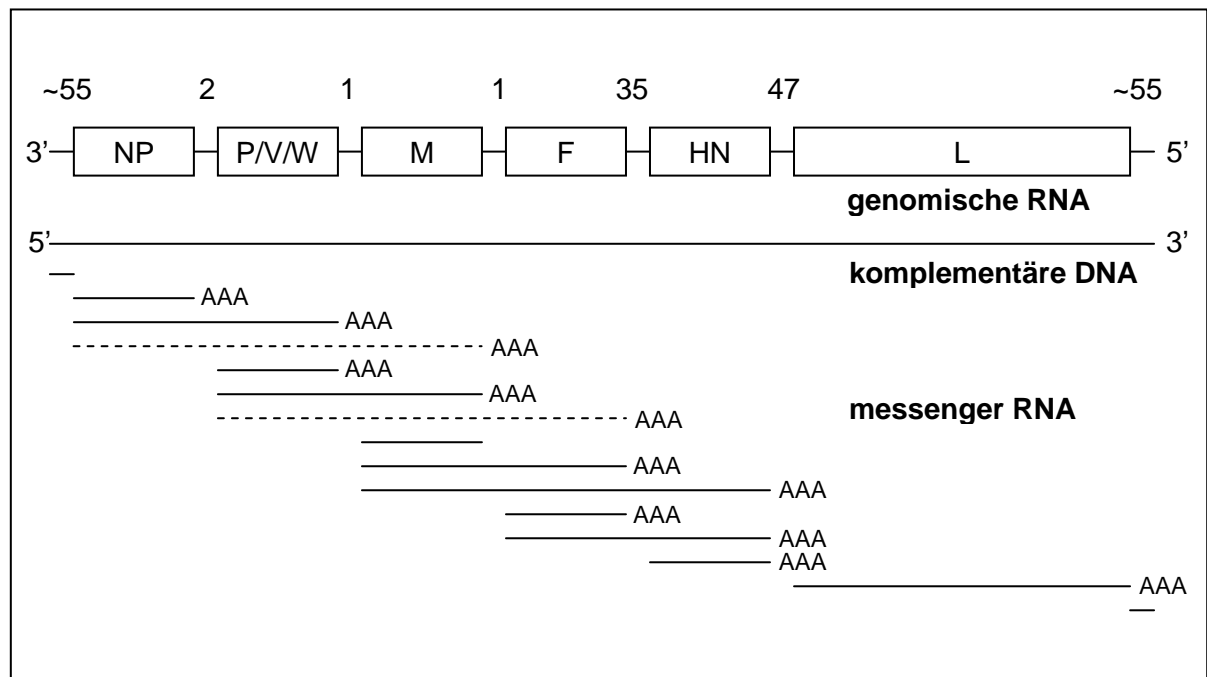


Abb 1: Aufbau des Newcastle Disease Virus Genoms und dessen mono- und polycistronischen Transkriptionsprodukten.

Die gestrichelt dargestellten Linien stellen polycistronische mRNA Fragmente dar, deren Transkription vermutet wird, aber noch nicht bewiesen ist (TOYODA, 1987). Die „AAA“ Anhänge stehen für die Polyadenylierung der Transkriptionsprodukte, wobei die 3' und 5' nichtkodierenden Enden keiner Polyadenylierung unterliegen. Über den jeweiligen nichtkodierenden Intergenregionen ist deren Länge in Basenpaaren dargestellt (YUSOFF, 2001).

2.4.2 Genotypisierung

Auf Genomebene lässt sich APMV-1 in zwei Klassen einteilen, die in Sequenzvergleichen deutlich voneinander abweichen (CZEGLEDI et al, 2006; KIM et al, 2007a; SEAL et al, 2004). Die Klasse II umfasst in neun Genotypen alle klassischen Impf- und Seuchenstämmen des Wirtschaftsgeflügels sowie die Paramyxoviren der Taube (Genotyp VI) (COLLINS et al, 1993; KIM et al, 2007a). Die Genoklasse I beinhaltet Stämme, die in den meisten Fällen aus Wassergeflügel stammen und weltweit isoliert wurden. Abb. 2 stellt eine Auswahl repräsentativer

Stämme aller Genotypen sowie die Eingruppierung der Stämme Herts 33 / 56 (Genotyp IV) und APMV 599 (Genotyp II) dar.

Der Serotyp 1 des aviären Paramyxovirus besteht aus einer genetisch relativ heterogenen Gruppe von Stämmen, deren Genotypisierung die variable Sequenz der F-Proteinspaltstelle als Einteilungsmerkmal nutzt. Daher erfolgt die Einteilung in Genotypen durch Sequenzvergleiche einer Region von ca. 600 Basenpaaren Länge auf dem für das F-Protein kodierenden Gen (COLLINS et al, 1993; KIM et al, 2007b). In der amerikanischen Literatur werden die Klasse II Viren weiterhin einer Einteilung in zwei Hauptgruppen unterzogen: weltweit vorkommende Viren und „exotische“ Newcastle Disease Viren, die von Wildvögeln stammen und in Nordamerika gewöhnlich nicht vorkommen (BROWN et al, 1999a; SEAL et al 1995, 1996).

CZEGLEDI et al (2006) zeigten einen Zusammenhang des Genotyps mit dem Zeitpunkt der Isolation des Stammes. So werden Klasse II Stämme unterteilt in Stämme, die zwischen 1930 und 1960 (Genotypen I-IV) und Stämme, die nach 1960 (Genotypen V-IX) isoliert wurden, was in den meisten Fällen mit der Gesamtgenomlänge von 15186 bzw. 15192 Basenpaaren korreliert. Die Genoklasse I beinhaltet ausnahmslos Stämme, die aus Wassergeflügel oder aus dem Umfeld von Lebendgeflügelmärkten isoliert wurden (KIM et al, 2007b) und die sich auf Genom- und Proteinebene stark von den Isolaten der Klasse 2 unterscheiden. Im Bereich der Sequenzen der für die Antigenität des Virus entscheidenden Proteine HN und F besteht eine Differenz von 15% zwischen den beiden Virusklassen im stark variablen Bereich der F-Proteinspaltstelle (MILLER et al, 2007).

Wie in Abb. 2 gezeigt werden die in Deutschland zugelassenen Impfstämme B1 und LaSota dem Genotyp II der Klasse II zugeordnet, der velogen viszerotrope Stamm Herts (Weybridge 33 / 56) gehört dem Genotyp IV an. Der ebenfalls in Deutschland verwendete Impfstamm Ulster sowie der in Australien eingesetzte Impfstamm V4 sind als Genotyp I einzuordnen.

Die am 3'-Ende des Genoms lokalisierte Sequenz, die für das NP-Protein kodiert, weist einen deutlich höheren Konservierungsgrad als die zur Genotypisierung verwendete F-Protein Spaltstellensequenz auf. Sie unterscheidet sich jedoch bei Isolaten, die vor 1970 in den USA isoliert wurden, unter ihnen auch die klassischen Impfstämme LaSota und B1, von weltweit zirkulierenden Isolaten (SEAL et al, 2005).

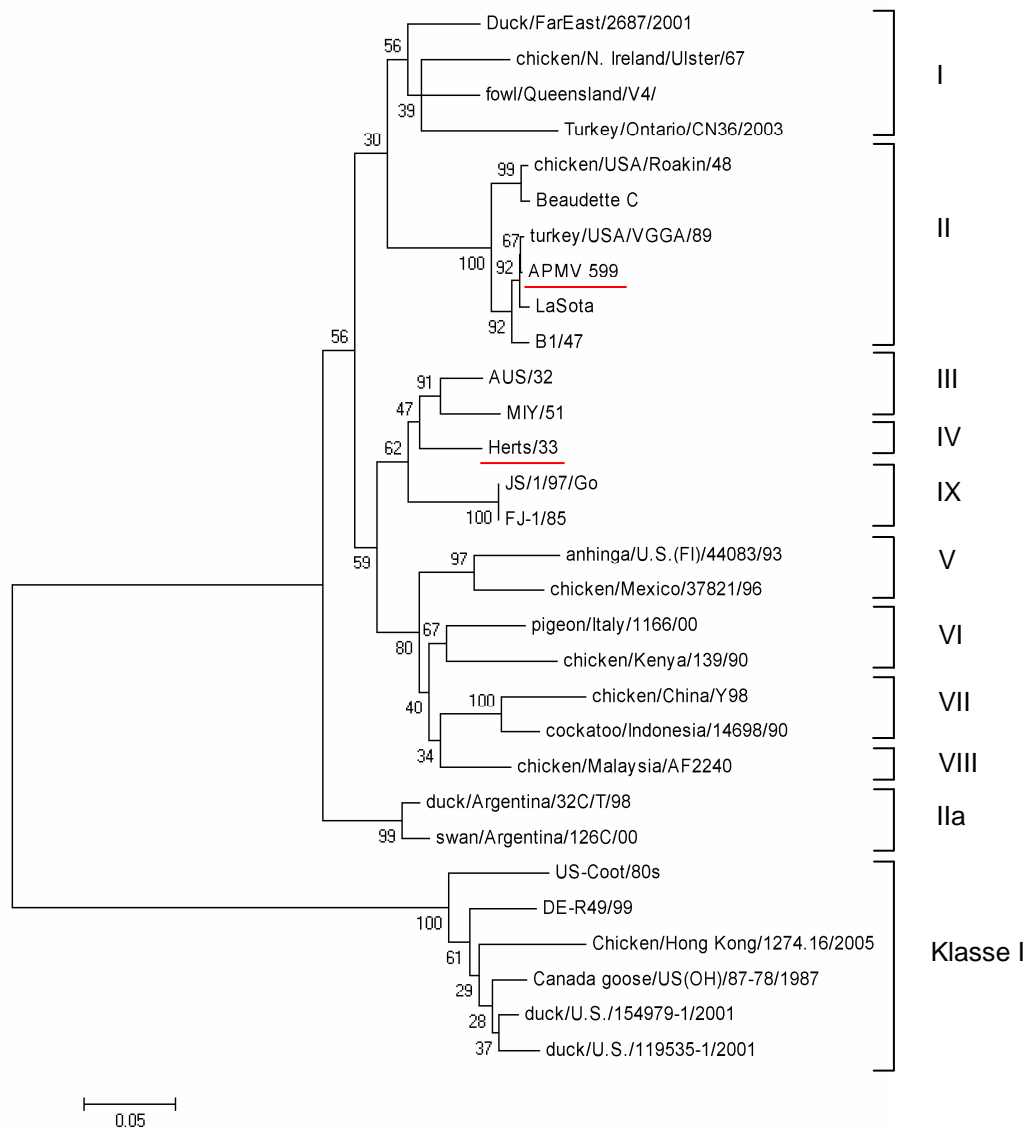


Abb 2: Typisierung von Stämmen des aviären Paramyxovirus vom Serotyp 1. Gruppiert wurde anhand eines amplifizierten Genabschnitts des F-Proteingens von 374 Basenpaaren Länge, der die F-Proteinspaltstelle mit einschliesst (ALDOUS et al, 2001; COLLINS et al, 1993; CZEGLIEDI et al, 2006; KIM et al, 2007a). Die Sequenzen wurden mittels Clustal W Methode miteinander verglichen und mittels Neighbor Joining Methode mit 500 *Bootstrap Values* phylogenetisch analysiert (Programm: MEGA 4.0, TAMURA et al, 2007). Die Einteilung in die Genotypen erfolgte nach KIM et al, 2007a. Rot markiert sind der avirulente Stamm APMV 599, der dem Genotyp II zuzuordnen ist, sowie der velogene Stamm Herts (Weybridge 33 / 56), der dem Genotyp IV angehört.

2.5 APMV 599

Bei dem APMV-1 Isolat 599 handelt es sich um eines von sechs aus dem Rückenmark von Papageien gewonnenen Isolaten, welches hinsichtlich seiner biologischen und antigenetischen Eigenschaften Ähnlichkeiten mit den klassischen Impfstämmen aufweist, jedoch eine noch stärker abgeschwächte Virulenz zeigt (GRUND et al, 2002). Anhand ausgewählter Sequenzen der HN- und F-Proteingene sind der Stamm 599 sowie weitere sehr schwachpathogene APMV-1 Stämme, die aus dem Rückenmark von Papageien isoliert wurden, dem Genotyp II der Genoklasse II zuzuordnen und erwiesen sich bei Sequenzvergleichen von Abschnitten des HN und F Gens als genetisch eng verwandt mit dem Impfstamm Hitchner B1 (GRUND et al, 2002; MOHN, 2005). Die Abgrenzung der Papageienstämme zu dem Stamm LaSota gelang auch antigenetisch mittels der fehlenden Reaktivität mit dem monoklonalen Antikörper 7D4 (MEULEMANS et al, 1987). Weiterhin zeigte der Stamm 599 analog zum Impfstamm B1 eine rasche Elutionszeit von Hühnererythrozyten (SPALATIN et al, 1970) und eine hohe Thermosensitivität (HANSON & SPALATIN, 1978).

Bei der Anzucht in 9- bis 11-tägigen embryonierten Hühnereiern zeigt der Stamm 599 in Vergleich mit B1 eine deutlich reduzierte Virulenz, was anhand der Differenz aus embryoinfektöser und embryothaler Dosis errechnet werden konnte (Abb. 3). Es kommt zu einem Überleben infizierter Embryonen, was bei den lentogenen Impfstämmen und höhervirulenten Pathotypen nicht geschieht. Bei der systemischen Infektion von Eintagsküken ins Gehirn im Rahmen einer Pathogenitätsprüfung (ICPI) verursachte das Virus keine klinische Beeinträchtigung der Tiere und gilt somit als avirulent (GRUND et al, 2002).

Tab. 3 Intracerebraler Pathogenitätsindex und Pathogenität im Hühnerei der schwachvirulenten Papageienisolate (modifiziert nach GRUND et al, 2002)

	Isolat	Intracerebraler Pathogenitätsindex	ELD ₅₀ / ELD ₅₀
Papageienstämme	472	0.09	41,1
	599	0	302,2
	624	0.03	65,8
	625	0.1	8,3
	626	0.01	233,6
	871	0.1	22,4
Impfstämme	LaSota	0.2 ¹ / 0.4 ²	1,7
	B1	0.1 ¹ / 0.2 ²	2,4

¹ HANSON, 1980

² ALEXANDER et al, 1997

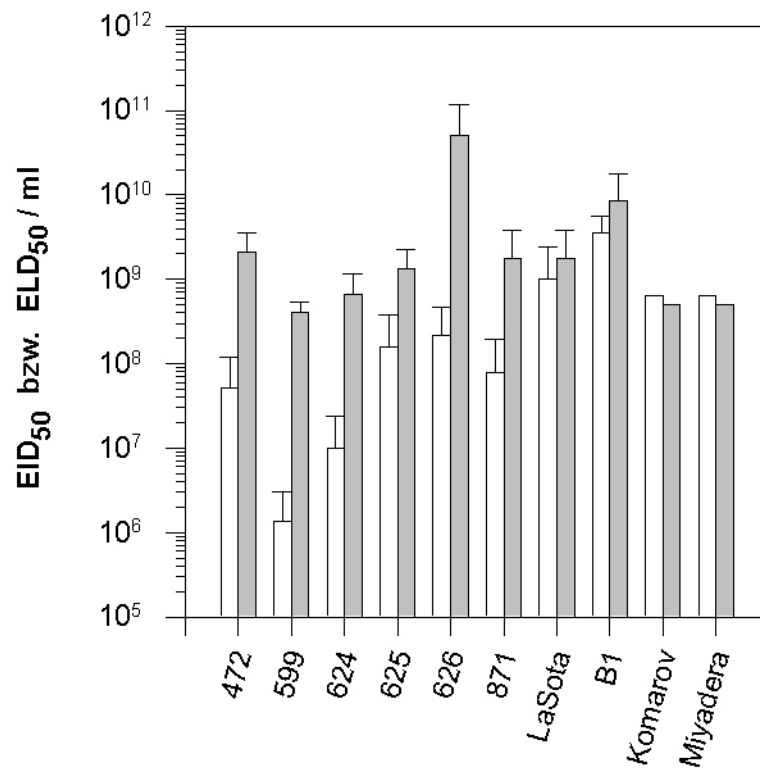


Abb. 3 In ovo Pathogenität der isolierten Papageienstämme. Dargestellt sind die eiinfektiöse (□) und eilethale (■) Dosen von isolierten Papageienstämmen (472 bis 871) nach Beimpfung in 9 bis 11 tägige embryonierte Hühnereier vergleichend mit dem Impfstämmen LaSota und B1 sowie dem mesogenen Stamm Komarov und dem velogenen Stamm Miyadera). Die Differenz aus EID_{50} und ELD_{50} repräsentiert die Überlebensrate infizierter Embryonen über den Beobachtungszeitraum (Grafik: modifiziert nach GRUND et al, 2002).

2.6 Pathotypisierung

Das aviäre Paramyxovirus weist nicht nur auf Genom- und Proteinebene grosse stammspezifische Heterogenität auf, auch in seinen Pathogenitätseigenschaften zeigt es deutliche Unterschiede. Die Einteilung des Newcastle Disease Virus in Pathotypen erfolgt anhand des verursachten klinischen Bildes mittels biologischer Assays, deren Durchführung gesetzlich geregelt ist (Richtlinie 92/66/EWG). Diese Richtlinie sowie die von der Organisation Internationale des Épizooties (O.I.E.) implementierte Charakterisierung erfolgt mittels der Ermittlung des intracerebralen Pathogenitätsindex, bei dem Eintagsküken intracerebral mit Virus inokuliert werden (ALEXANDER, 1989; O.I.E. 2008; Richtlinie 92/66/EWG).

Anhand des klinischen Bildes acht Tage nach Infektion erfolgt die Ermittlung des Index, nach dem APMV-1 Stämme in drei verschiedene Pathotypen eingeteilt werden (ALDOUS & ALEXANDER, 2001; BEARD & HANSON, 1984).

- **velogen:** ICPI über 1,2,
mit weiterer Unterteilung in **velogen viscerotrop** als Verursacher perakuter systemischer Infektionsverläufe und **velogen neurotrop** als Verursacher protrahierter Verläufe, die sich in erster Linie in respiratorischer und zentralnervöser Symptomatik äussern.
- **mesogen:** ICPI zwischen 0,7 und 1,2
- **lentogen:** ICPI unter 0,7

Auch die Infektion embryonierter Hühnereier mit anschliessender Untersuchung der Infektionsrate und Embryoletalität gibt Hinweise auf die Pathogenität eines Stammes.

Diese werden durch Beimpfung von 9- bis 11-tägigen bebrüteten Hühnereiern und anschliessender Ermittlung der durchschnittlichen Absterbezeit („mean death time“, MDT) durchgeführt (ALEXANDER, 1991; O.I.E., 2004).

Indikativ für die Pathogenität eines Stammes ist auch die Anzucht in der Zellkultur, wobei velogene Stämme im Gegensatz zu lentogenen Stämmen in der Lage sind, auf aviären Fibroblasten und Säugetierzellen (MDBK, BHK21-F) trypsinunabhängig zu replizieren, was auf die Spaltbarkeit des F-Proteins durch ubiquitäre Proteasen hinweist (GARTEN, 1980a; KALETA et al, 1979; KING, 1993; ROTT, 1979; Richtlinie 92/66/EWG).

In zunehmendem Masse werden molekulare Methoden auf Genomebene für die Pathotypisierung genutzt. Als massgeblicher Indikator für die Pathogenität eines APMV-1 Stammes gilt die Proteinsequenz, an der das F₀-Protein in seine funktionellen Untereinheiten F₁ und F₂ gespalten wird (GARTEN, 1980a; NAGAI, 1976; PEETERS, 1999). Die Abhängigkeit der Pathogenität von der Spaltung eines Oberflächenproteins findet sich auch bei anderen Myxoviren wie Sendavirus (F₀ Protein) (TASHIRO et al, 1992a) und schwachpathogenem aviären Influenzavirus (HA₀-Protein) (STEINHAEUER, 1999).

Daher nutzen die molekularen Untersuchungen zur Pathogenität die Heterogenität der F-Protein Spaltstellensequenz, wobei Virusstämme mit velogenen Eigenschaften zumeist eine polybasische Aminosäurenabfolge am carboxyterminalen Ende des F₂ Fragments (Positionen 112/113 und 115/116) sowie Phenylalanin (F) am aminoterminalen Ende des F₁ Proteins (Position 117) aufweisen. Bei lentogenen Stämmen hingegen ist die Aminosäurenabfolge monobasisch und an der Position 117 ist Lysin (L) inkorporiert (ALDOUS, 2001; COLLINS et al, 1993; TOYODA, 1987; WERNER et al, 1999). Die molekularbiologische Einteilung in Pathotypen lässt im Unterschied zu der biologischen Einteilung nur eine Differenzierung von apathogenen und lentogenen zu meso- und velogenen Pathotypen zu. Eine weitere Feindifferenzierung innerhalb dieser Einteilungen ist auf molekularbiologischer Ebene nicht zu treffen.

Die Pathogenität des Virus ist jedoch nicht ausschliesslich von dieser Sequenz abhängig. So zeigen mesogene Stämme teilweise eine hochpathogene Spaltstelle. Auch bei lentogenen Rekombinanten mit inserierter velogener F-Protein Spaltstelle war keine drastische Pathogenitätssteigerung festzustellen (WAKAMATSU et al,

2006a). Als weitere die Pathogenität beeinflussende Komponente wird die Sequenz des HN Proteins angenommen. RÖMER-OBEDDÖRFER et al (2003) zeigten, dass die Virulenz weitgehend unabhängig von der Länge des HN₀-Proteins ist, sondern vielmehr vom Austausch einzelner Aminosäuren in der globulären Kopfregion des HN-Proteins abhängt. Aber auch die Abhängigkeit der Pathogenität von der Länge und Glykosylierung des HN-Proteins und infolge dessen seiner Interaktion mit dem F-Protein ist beschrieben (GARTEN et al, 1980b; STONE-HULSLANDER & MORRISON, 1997). Durch die gezielte Mutation von Aminosäuren der F und HN Proteine bzw. den Ersatz der lentogenen F- und HN-Proteingene durch die Sequenzen velogener Viren konnte eine Virulenzsteigerung gezeigt werden (RÖMER-OBEDDÖRFER et al, 2006; WAKAMATSU et al, 2006a).

2.7 Klinik, Pathologie und histologische Veränderungen

Die klinischen Symptome bei einer Infektion mit APMV-1 sind abhängig von der Pathogenität und dem Tropismus des Virusstammes, der Wirtsspezies, des Alters und des Immunstatus des Wirtes sowie des Infektionsweges (ALEXANDER, 1995, 2008; BROWN et al 1999; KING, 1996). So kann eine Infektion klinisch inapparent bleiben, es können aber unter anderen Bedingungen auch ausnehmend schwere klinische Symptome auftreten. Die empfänglichsten Wirtschaftsgeflügelsspezies für eine klinische Manifestation der Newcastle Disease sind Hühner und Puten. Allerdings kann sich das klinische Bild desselben Isolats tierartlich stark unterscheiden. Dies zeigten BRUGH & BEARD (1984) anhand eines Papageienisolats, welches bei Papageien ein velogen viszerotropes klinisches Bild, in Hühnern jedoch sehr heterogene Krankheitsverläufe mit wenig gastrointestinaler Beteiligung verursachte. Die Symptomatik lentogener Viren beschränkt sich zumeist auf milde respiratorische Beeinträchtigungen und vereinzelt Durchfall, die zumeist ohne weitere Folgeschäden abheilen. Zudem besteht bei einer vorangegangenen Infektion mit schwachvirulenten APMV eine erhöhte Empfänglichkeit für Sekundärinfektionen mit selektiv pathogenen Keimen wie *Escherichia coli* und *Mycoplasma gallisepticum* (NAKAMURA, 1994; FICKEN, 1987).

Das klinische Bild velogen viscerotroper Stämme ist zumeist mit schweren hämorrhagischen intestinalen Veränderungen verbunden, insbesondere sind

Proventriculus, Dünndarm und Zäkum betroffen. Eine Infektion mit velogen neurotrophen Virusstämmen hat hingegen in erster Linie akute respiratorische Symptome sowie zentralnervöse Ausfälle zur Folge, die sich in Opisthotonus, Torticollis, Ataxie und Parese der Ständer äussern (ALEXANDER, 2008; CHEVILLE et al, 1972; GALLILI & BEN-NATHAN, 1998). Bei einer Infektion mit velogenen Pathotypen treten auch perakute Krankheitsverläufe auf, die zum plötzlichen schnellen Tod der Tiere ohne sichtbare klinische Erkrankungen führen.

Die pathologischen Veränderungen sind wie auch das klinische Bild stark von Virusstamm, der Wirtsspezies und dem klinischen Verlauf abhängig.

Bei perakuten Krankheitsverläufen sind häufig keine sichtbaren pathologischen Veränderungen evident. Bei protrahierteren Krankheitsverläufen sind die häufigsten pathologischen Veränderungen hämorrhagische Veränderungen der Schleimhäute des Respirations- und Gastrointestinaltraktes. Weiterhin kommt es in einigen Fällen zu Nekrosen der lymphoiden Gewebe in Milz, Darm und der Zäkaltonsille (BROWN et al, 1999b, 1999c).

Histologisch sind bei Infektionen mit respirotropen lentogenen Stämmen hauptsächlich Veränderungen in Lunge und Trachea sichtbar, wobei die Veränderungen bei einer Infektion sehr junger Tiere am deutlichsten auftreten. Diese bestehen aus einer Hypertrophie der Becherzellen, die in vermehrter Produktion von Mukus und einem Absterben der Zilien resultiert (MAST et al, 2005). LAM (2003) zeigte eine Depletion der trachealen Epithelzellen und eine Schädigung der Zilien. Die Art der histopathologischen Veränderungen der Trachea und des Respirationstraktes tritt auch bei der Infektion mit lentogenen Virusstämmen auf (KOMMERS et al, 2003) und ist weitgehend unabhängig von der Pathogenität des eingesetzten Stammes (BEARD & EASTERDAY, 1967).

Bei der Infektion mit velogenen Virusstämmen kommt es zur grossflächigen Nekrose lymphoiden Gewebes in Milz und Gastrointestinaltrakt (BROWN et al, 1999). Auch lymphoide Depletion kann beobachtet werden, von der vermutet wird, dass diese durch Apoptose ausgelöst wird (KOMMERS et al, 2003). OJOK & BROWN (1996) beobachteten ebenfalls auf makroskopischer und histologischer Ebene eine deutliche Schädigung des lymphoiden Gewebes nach okulonasaler Infektion mit dem velogen vicerotropen Virusstamm Fontana.

Weiterhin konnte nach experimenteller Infektion spezifisch pathogenfreier Tiere mit velogenem Virus Apoptose in den mononukleären Zellen des peripheren Blutstroms

sowie eine Perforation der Erythrozyten beobachtet werden (LAM, 1996, 2003). Auch nach der Beimpfung von Hühnereiern in die Allantoishöhle sind eine Fragmentierung von DNA nach 24 Stunden im Gehirn bzw. 36 Stunden im Herzen sowie elektronenmikroskopisch sichtbare apoptotische Körperchen nachweisbar. Diese weisen auf eine Zellschädigung und letztendlich den Tod des Embryos durch Apoptose der Zellen von Herz und Gehirn hin (LAM et al, 1995).

2.8 Virustropismus

Der Virustropismus des aviären Paramyxovirus zeigt grosse stammspezifische Unterschiede und ist stark abhängig von der Fähigkeit des Virus, die proteolytische Spaltstelle des F₀-Proteins trypsinunabhängig zu spalten. AL-GARIB et al (2003) wiesen mittels Untersuchungen von Hühnerembryonen das Überschreiten der Epithelbarriere durch einen velogenen Virusstamm, der ein Fluoreszenzprotein exprimiert, nach. In dieser Untersuchung war velogenes Virus dazu in der Lage, eine systemische Infektion in einer Vielzahl von Organen und Geweben, insbesondere Herz und Milz, hervorzurufen. Eine Affinität hochpathogener Virusstämme für die lymphatischen Gewebe der Milz und des Gastrointestinaltrakts wurde auch von anderen Autoren nachgewiesen. (BROWN 1999b; KOMMERS, 2003).

Im Gegensatz zu den Untersuchungen an velogenen Stämmen war lentogenes Virus lediglich im CAM, Haut und zu späteren Embryonalstadien auch im Epithel der Lunge nachzuweisen (AL-GARIB et al, 2003). OLDONI et al (2005) erhielten nach der Beimpfung mit Wildtyp La Sota ähnliche Ergebnisse, hier konnte per Immunhistochemie und in situ Hybridisierung lentogenes Virus auf der CAM, in den Luftsäcken und im Oesophagus nachgewiesen werden. Auch die von NAGAI et al (1979) durchgeführten Untersuchungen zum Virusnachweis mittels direkter Verfahren und Immunhistochemie konnten keine Ausbreitung über das Ektoderm der CAM hinaus durch schwachvirulentes Virus nachweisen. OGASAWARA et al (1992) verfolgten den Gedanken, dass eine Infektion von Zellen durch lentogene Virusstämme zwar möglich ist, jedoch durch das Fehlen ektopisch exprimierter endogener Proteasen keine Replikation stattfindet, so dass die Viren in einer inaktiven zygotischen Form in der Zelle verbleiben.

Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen zum Virustropismus bei geschlüpften Eintagsküken, die embryonal mit einem durch Ethylmethan Sulfonat (EMS) attenuierten Lebendvirus eines B1-Stammes beimpft wurden. Es konnte Virus in der Milz der Küken nachgewiesen werden, was für eine systemische Ausbreitung des Virus im Hühnerembryo spricht (AHMAD & SHARMA, 1992). Auch bei Immunisierung vierwöchiger Hühner vermochten meso- und lentogene Stämme systemische Infektionen in Myocard und Luftsackepithel zu setzen (BROWN et al, 1999b).

Kontrovers diskutiert wird der zentralnervöse Tropismus von Newcastle Disease Virus. BROWN et al (1999b) konnten nach der konjunktivalen Infektion mit velogen neurotrophen Stämmen trotz deutlicher zentralnervöser Klinik nur sehr geringe Mengen von Virusantigen im ZNS mittels in situ Hybridisierung nachweisen. Im Gegensatz dazu fanden LIU et al (2007) bei gleichem Infektionsweg rekombinantes, mit grünem Fluoreszenzprotein markiertes velogenes Virus des Gänsestammes ZJ1 problemlos in Gehirn, Lunge und Niere wieder.

Bei den meisten schwachvirulenten Stämmen ist eine Präferenz für entweder Gastrointestinal- oder Respirationstrakt des Huhnes feststellbar. Untersuchungen an vollständigen Genomsequenzen weisen bei Stämmen des Genotyps II einen Tropismus für den Respirationstrakt nach, während Impfstämme des Genotyps I wie Ulster und QV4 primär eine Affinität für Zellen des Gastrointestinaltraktes aufweisen (PEROZO et al, 2008b). Dies ist in Einklang mit den Beobachtungen von ALEXANDER (2008), der eine Prädisposition für den Respirationstrakt bei den in Europa meistgenutzten Impfstämmen LaSota und Hitchner B1 zeigte. Der in Australien genutzte Impfstamm V4 weist während der frühen Infektionsphase eine Replikation im Darmepithel auf, während der thermostabile Impfstamm I-2 bei gleicher Applikationsart eine Affinität zu respiratorischem Epithel zeigt (WAMBURA et al, 2006). Untersuchungen zur Ursache der Unterschiede im Tropismus auf molekularbiologischer Ebene wurden an dem aus Puten isolierten lentogenen Stamm VG/GA, der als Impfstamm genutzt wird und seinem infektiösen Klon 5 durchgeführt. Der Stamm VG/GA weist im Vergleich zu seinem infektiösen Klon, der primär im respiratorischen Epithel repliziert, einen deutlichen gastrointestinalen Tropismus auf. Bei Sequenzuntersuchungen auf der gesamten Genomlänge zeigten sich drei Sequenzabweichungen auf Aminosäureebene im Bereich des F-Proteins sowie

sechs Aminosäureabweichungen im Bereich des HN-Proteins (PEROZO et al, 2008b).

Es wird angenommen, dass lentogene Stämme für die Spaltung des F₀ Vorläuferproteins auf Proteasen angewiesen sind, die einen einzelnen Argininrest (R) erkennen, wie dies bei trypsinartigen Proteasen der Fall ist. In Gegensatz dazu sind meso- und velogene Stämme in der Lage, ubiquitäre zelluläre Endoproteasen zu diesem Zweck nutzen zu können (ROTT et al, 1979; STEINHAEUER, 1999). Dies hat zur Folge, dass velogene Stämme trypsinunabhängig befähigt sind, eine systemische Infektion hervorzurufen, während die Replikation lentogener Stämme auf epitheliale Gewebe des Respirations- und Digestionstrakts, in denen trypsinartige Proteasen vorliegen, beschränkt ist (ALDOUS & ALEXANDER, 2001; GARTEN et al, 1980a; NAGAI et al, 1976).

Bei der Untersuchung der Replikationseigenschaften meso- und velogener Stämme des Newcastle Disease Virus zeigte sich, dass es sich bei den ubiquitären endogenen Proteasen, die das Virus zur Spaltung des F₀-Proteins nutzt, um subtilisinartige Proteasen, möglicherweise um Furin, handelt (FUJII, 1999). Die Spaltung des F₀ velogener NDV Stämme findet intracellulär am trans Golgi Netzwerk statt (SAKAGUCHI, 1991; KAWAHARA, 1992).

Im Gegensatz hierzu wurde bei der Untersuchung von Sendaivirus und lentogenem Newcastle Disease Virus (Stamm Ulster) in Allantiosflüssigkeit des Hühnerembryos eine Protease nachgewiesen, die in der Lage ist, eine 10³ bis 10⁴-fache Steigerung der Spaltung des F₀-Proteins zu bewirken. Inhibitionsexperimente zeigten eine Verwandtschaft, aber keine komplette Übereinstimmung dieser Protease mit Trypsin (MURAMATSU & HOMMA, 1980; APPLEYARD & DAVIS, 1983). Die weitergehende Charakterisierung dieser Protease zeigte eine vollständige Homologie zu humanem und bovinem Faktor Xa (GOTOH et al, 1990; 1992). Bei Faktor Xa handelt es sich um eine Ca²⁺ und Vitamin K abhängige Serinprotease, welche bei der Blutgerinnung zur Umsetzung von Prothrombin in Thrombin verantwortlich ist (OGASAWARA, 1992; GOTOH, 1990; 1992). Diese wird in Form von Faktor X (FX) als Vorläuferprotein synthetisiert und im Ablauf der Blutgerinnungskaskade mittels proteolytischer Aktivierung zu seiner aktiven Form Faktor Xa (FXa) gespalten. Auch bei der F₀ spaltenden Protease bedarf es einer proteolytischen Aktivierung des Vorläuferproteins (GOTOH et al, 1990, 1992). Immunhistochemische Nachweise zur Gewebslokalisation von lentogenem Newcastle Disease Virus (Stamm Ulster)

decken sich mit analogen Untersuchungen zur Lokalisation des aktivierten Faktor Xa (OGASAWARA et al, 1992). Das Vorläuferprotein FX ist in der Allantois-, nicht jedoch in der Amnionflüssigkeit zu finden, dort liegt die Protease ausschliesslich in ihrer aktivierten Form vor. Weiterhin wurde FX in Leber, Milz, Niere und Gastrointestinaltrakt nachgewiesen, allerdings lediglich in seiner inaktiven Form, so dass angenommen wird, dass die Virusreplikation an den Epithelien des Gastrointestinaltraktes durch abgeschlucktes aktiviertes Enzym aus der Amnionflüssigkeit induziert wird (OGASAWARA et al, 1992). Am Beispiel von Sendavirus wurde als weitere Determinante für die Fähigkeit einer systemischen Ausbreitung die apikale bzw. bipolare Knospung des Virus ermittelt. Eine Mutante des Sendavirus, der spezifische Mutationen in der Aminosäure 115 des F-Proteins und den Aminosäuren 128 und 210 des M-Proteins aufweist, vermochte eine bipolare Knospung des Virus und eine systemische Infektion auszulösen, während die Replikation des Wildtyps auf den Respirationstrakt beschränkt blieb (TASHIRO et al, 1992).

Neben den Beteiligungen der F-, M- und HN-Proteine an Virulenz und Tropismus des Virus hat auch das V-Protein eine funktionelle Bedeutung für Virustropismus und Pathogenität im Hühnerembryo (MEBATION, 2001). Es handelt sich bei der Ausbildung von Tropismus und Virulenz also um ein komplexes Geschehen, welches durch viele Faktoren auf Virus- und Wirtsebene beeinflusst wird.

2.9 Gesetzliche Regelung

Aufgrund ihrer grossen wirtschaftlichen Bedeutung wird die Newcastle Disease bei der Organisation Internationale des Épizooties (O.I.E.) als anzeigepflichtige Tierseuche geführt. Im Falle eines Ausbruchs bedarf es einer Meldung an die O.I.E. sowie einer monatlichen Benachrichtigung der Länder über den aktuellen Seuchenstatus.

Im Rahmen der Tierseuchengesetzgebung des Europäischen Wirtschaftsraums (Richtlinie 92/66/EWG) und auf nationaler Ebene (Tierseuchengesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 13. Dezember 2007; Geflügelpestverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 20. Dezember 2005) sind

Prophylaxemassnahmen sowie Hygienemanagement und Schutzmassregeln im Falle eines Ausbruchs festgelegt.

Die Zulassung und Prüfung von Impfstoffen unterliegen der Tierimpfstoffverordnung in der Bekanntmachung der Fassung vom 24. Oktober 2006. Methodisch unterliegt die Prüfung von Tierimpfstoffen den Formvorgaben, die im Europäischen Arzneibuch (6. Fassung vom 01. Januar 2008) verankert sind.

Die Impfung von Hühnern und Puten gegen das Newcastle Disease Virus ist in den meisten europäischen Ländern gesetzlich geregelt, die Gesetzeslagen der europäischen Länder hinsichtlich der Impfung sind jedoch sehr heterogen. In Deutschland besteht nach der Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle-Krankheit vom 20. Dezember 2005 eine Impfpflicht für Hühner und Puten. Als Impfstoffe sind zugelassene Impfstoffe (Bundesanzeiger-Veröffentlichung Nr. 323 vom 08. Mai 2008) einzusetzen.

2.10 Diagnostische Möglichkeiten

Der diagnostische Nachweis von Newcastle Disease Virus sowie spezifischen Antikörpern gegen diesen Erreger erfolgt in Deutschland anhand der europäischen Richtlinie 92/66/EWG und den in deren Anhang angeführten Methoden. Ein weltweiter Standardisierungsvorschlag wird von der O.I.E. in Form des „Manual of Diagnostic Tests und Vaccines for Terrestrial Animals“ (2008, Kapitel 2.3.14, Newcastle Disease) herausgegeben.

2.10.1 Serologischer Nachweis

Der serologische Nachweis APMV-spezifischer Antikörper ist insbesondere bei der Überprüfung des Erfolgs der gesetzlich vorgeschriebenen Impfung wichtig. Die Nachweispflicht des Impferfolgs liegt beim Tierhalter. Nach Vorgaben der O.I.E. sowie der Richtlinie 92/66/EWG gilt der Hämagglutinationshemmungstest als serologischer Standardtest. Als Standardantigen wird auf europäischer Ebene der Stamm Ulster 2C vorgeschlagen (Richtlinie 92/66/EWG).

Hinzu kommen enzymverstärkte Assays (ELISA) zum Nachweis viraler Antikörper, die vom Hersteller validiert und länderspezifisch zugelassen werden. Diese

verwenden zur Detektion Vollvirusantigen, rekombinante Proteine oder „subunit“ Antigen. Momentan besteht in Deutschland eine Zulassung für vier Testkits, von denen einer kommerziell vermarktet wird. Dieser basiert auf dem Sandwichprinzip und nutzt ein plattengebundenes rekombinantes Virushüllprotein.

2.10.2 Antigennachweis

Ein Nachweis von Virus wird per Anzucht im embryonierten spezifisch pathogenfreien Hühnerei mit anschließender Ernte der Allantoisflüssigkeit und Charakterisierung des Isolats geführt. Die Charakterisierung schliesst sich an eine Überprüfung auf hämagglutinierende Agenzien sowie eine Kontrolle auf bakterielle Sterilität an (ALEXANDER, 1989). Bei Nachweis eines hämagglutinierenden Virus erfolgt die Typisierung des Isolats mittels Hämagglutinationshemmungstest anhand einer standardisierten Zusammenstellung polyklonaler Seren gegen Influenza A Viren sowie Paramyxovirus der Serotypen 1 bis 9. Eine weitere serologische Feindifferenzierung kann mit Hilfe einer standardisierten Palette monoklonaler Antikörper aus der Maus erzielt werden (ALEXANDER, 1997). Anhand dieser Bindungsmuster lassen sich sogar einzelne Stämme desselben Genotyps wie die Impfstämme LaSota und B1 voneinander unterscheiden (MEULEMANS et al, 1987). Dieser Differenzierung schließt sich die Pathotypisierung mittels ICPI auf biologischer oder über die Bestimmung der F-Protein Spaltstellensequenz auf molekularer Ebene an.

2.10.3 Molekularbiologischer Nachweis und Differenzierung

Zu weiteren Differenzierung stehen molekularbiologische Methoden zur Verfügung, die in Abhängigkeit von der Qualität der Probe bzw. des Isolats das Spektrum der klassischen Diagnostik erweitern können. Die dabei am häufigsten eingesetzte Polymerasekettenreaktion (PCR) basiert auf der Amplifikation eines von zwei spezifischen hybridisierenden Oligonukleotiden, den *Primern*, eingerahmten Fragments durch eine zyklische, enzymatische Reaktion, bei der durch eine DNA-Polymerase sequentiell Deoxynukleotide an einen Komplementärstrang angelagert werden. Ein Amplifikationszyklus ist untergliedert in die Abschnitte der Denaturierung zur Trennung des doppelsträngigen DNA Strangs ($>90^{\circ}\text{C}$), Primeranlagerung (in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Primer $50\text{-}75^{\circ}\text{C}$) sowie Verlängerung des synthetisierten DNA Strangs ($72\text{-}78^{\circ}\text{C}$). Die Darstellung der

Amplifikationsprodukte erfolgt durch Agarosegelelektrophorese und Anfärbung mit interkalierenden Farbstoffe wie Ethidiumbromid, die sich an doppelsträngige Nukleinsäureabschnitte anlagern (GAVRILENKO, 2006).

Die quantitative oder *Real Time* RT-PCR entwickelte sich in den letzten Jahren zu einer schnellen, einfach anzuwendenden und günstigen diagnostischen Methode und wird deshalb zunehmend im Bereich der Diagnostik von Krankheitserregern angewandt. Sie beruht auf der Messung von Fluoreszenz, die mit der Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnitts assoziiert ist. Dies kann entweder mit interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR Green™, die sich in die doppelsträngige DNA einlagern (HIGUCHI, 1993) oder mittels sequenzspezifischer Sonden (SAMBROOK et al, 1989) erfolgen. Die Darstellung erfolgt in grafischer Form, wobei die Fluoreszenz auf der Abszisse gegen die Zyklenzahl auf der Ordinate aufgetragen wird.

Es wurden diverse Protokolle zum Nachweis viraler RNA des aviären Paramyxovirus entwickelt, die unterschiedliche Ziele verfolgen. Zur Erfassung eines möglichst grossen Virusspektrums aus Feldproben wird ein Assay benötigt, das in der Lage ist, mit einer möglichst breiten diagnostischen Sensitivität virale RNA nachzuweisen, um der Heterogenität der Stämme Rechnung zu tragen. Im Gegensatz dazu wird für die Feindifferenzierung sowie für die Pathotypisierung auf molekularer Ebene ein Assay benötigt, welches auch eine Abweichung einzelner Nukleotide auf Genomebene erkennt und wiedergibt.

Eine Vielzahl von Polymerasekettenreaktionen (PCR) Protokollen, die mehrheitlich Fragmente variierender Länge auf dem F-Proteingen amplifizieren, kam bisher zur Anwendung (BARBEZANGE & JESTIN, 2002; JESTIN & JESTIN, 1991; JESTIN & CHERBONNEL, 1992; KANT, 1997; KHO et al, 2000). Eine tabellarische Zusammenfassung der bis zum Jahr 2001 entwickelten Protokolle und ihrer Anwendungen ist bei ALDOUS & ALEXANDER (2001) zu finden. Die nach dieser Veröffentlichung entwickelten und publizierten molekularbiologischen Nachweisverfahren sind in Tab. 4 aufgeführt.

Zur Differenzierung und insbesondere zur Pathotypisierung von Virusstämmen wurden Assays entwickelt, die als Unterscheidungsmerkmal die Heterogenität im Bereich der F-Proteinspaltstelle nutzen. Besonderes Interesse gilt der Abgrenzung von lentogenen zu velogenen Stämmen. Dies wurde üblicherweise mittels Polymerasekettenreaktion, Agarosegelelektrophorese und anschliessender direkter

Sequenzierung der Amplifikationsprodukte erzielt (TOYODA et al, 1989; COLLINS et al, 1993; SEAL et al, 1995; KING & SEAL, 1997). Mit Hilfe des Einsatzes spezifisch bindender, markierter Sonden wurde der kostenintensive und aufwendige Sequenzierprozess umgangen. Zunächst wurde hierfür RNA Fingerprinting eingesetzt (McMILLAN & HANSON, 1982; PALMIERI & MITCHELL, 1991), welches von markierten Sonden (JARECKI-BLACK & KING, 1993; ALDOUS et al 2001) abgelöst wurde. Die in der Handhabung Entsorgung und Haltbarkeit anspruchsvollen radioaktiv markierten Sonden wurden schliesslich von fluoreszenzmarkierten Oligosonden abgelöst, die sich in der Diagnostik in Form von quantitativer PCR durchsetzten. Diese bieten insbesondere für den Durchsatz grosser Probenmengen Vorteile, da sie im 96-Loch Platten Format eingesetzt werden können und ein geschlossenes System ohne die Notwendigkeit einer postreaktionalen Prozessierung nutzen, welches bei einer grossen Anzahl von Proben Kontaminationen reduziert. Die in der vorliegenden Arbeit genutzten fluoreszierenden 5' Nuklease Oligosonden basieren auf dem System des *fluorescence resonance energy transfer* (FRET), bei dem Energie von einem Reportermolekül (*Fluorophore*) auf ein nicht fluoreszierendes *Quencher*-Molekül, welches sich 10-100 Angström entfernt befindet, überträgt (CLEGG, 1992). Bei der Amplifikation des spezifischen Fragments wird durch die 5'-3' Endonukleaseaktivität der *Taq* Polymerase eine Hydrolysierung der Oligosonde erwirkt, die eine Freisetzung des Reportermoleküls und somit eine Fluoreszenzemission im gemessenen Wellenlängenbereich (MACKAY et al, 2002) zur Folge hat. Die Zykluszahl, bei der die gemessene Fluoreszenz die zehnfache Standardabweichung von der Basisfluoreszenz überschreitet, wird als *threshold cycle* (C_T) bezeichnet. Dieser ist proportional zu der Anzahl der initial vorliegenden Kopienzahl der Zielsequenz (GIBSON, 1996; JUNG, 2000; MACKAY, 2002). Zur diagnostischen Anwendung für aviäres Paramyxovirus kommt in Deutschland das USDA-zertifizierte Protokoll nach WISE et al, 2004, eine weitere Sequenzierung der F-Proteinspaltstelle ist bei Bedarf anzuschliessen (COLLINS et al, 1993; KIM et al, 2007b).

Abb. 4 Molekularbiologische diagnostische Assays zum Nachweis viraler RNA des Newcastle Disease Virus, veröffentlicht seit 2001.

Autor	Assay	Amplifikat	Weitere Differenzierung
BERINSTEIN, 2001	Hetereoduplex mobility assay	F	
WANG et al, 2001	Triple RT-PCR	F	
CREELAN, 2002, 2006	RRT-PCR & Restriktionsenzymanalyse	F	
LI & ZHANG 2004	RT-PCR, Hybridisierungssassay	F	Differenzierung velogen-lentogen
TAN et al., 2004	RRT-PCR, SYBR Green		
TIWARI, 2004	RT-PCR	F	Differenzierung velogen-lentogen
WISE et al, 2004	RRT-PCR	M	
	RRT-PCR	F	Differenzierung von in Nordamerika vorkommenden und exotischen Isolaten
PHAM et al, 2005	Isotherme Amplifikation (RT-LAMP)	F	
LEE et al, 2006	Phage capture dot blot		Differenzierung velogen-lentogen
LAU, 2006	Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)	F	
CUI et al, 2007			
ANTAL et al, 2007	RRT-PCR, Light Upon eXtension (LUX) Primer	F	
KONG et al, 2007	Multiplex RT-PCR	F	
KIM et al, 2007	Multiplex RRT-PCR	L	
KIM et al, 2006	RRT-PCR	F	

Fortsetzung: Tab. 4

RODRIGUEZ-SANCHEZ et al, 2008	Multiplex RRT-PCR mit acht weiteren Tierseuchen	F
WANG et al, 2008	Nested RT-PCR & magnetic-bead Sonde (RAPID-BAP)	F

Da sowohl den Primern als auch der Sonde eine spezifischen Bindung an eine zu amplifizierende Sequenz zugrunde liegt ist die Auswahl der verwendeten Oligonukleotide für die Leistungsfähigkeit der PCR essentiell. In Anbetracht dessen wurde durch Modifikation der in die Sonde inkorporierten Oligonukleotide deren Bindungseigenschaften verbessert. Dies kann beispielsweise durch das Anheften von *minor groove binders* (MGB) an den Oligonukleotidstrang geschehen, welche den Sonden-DNA Dimer durch Einfaltung in den *minor groove* der doppelsträngigen DNA stabilisieren (KUTYAVIN et al, 2000, 2003). Modifikationen innerhalb des Nukleotids sind in der Nukleobase, dem Zuckerring oder der Phosphodiesterstruktur möglich (PETERSEN et al, 2003). Im Zuge der Verbesserung der Bindungseigenschaften wurden Nukleotide synthetisiert, deren Furanosering eine 2'-O, 4'-C-Methylenbindung aufweist und der dadurch in seine C3'-*endo* Konformation gezwungen wird (SINGH et al, 1998; KOSHKIN et al, 1998). Diese werden als *locked nucleic acids* (LNA) bezeichnet. Die Schmelztemperatur erhöht sich durch den Einsatz von LNA-Basen pro Base um 1 – 8°C bei der Hybridisierung mit DNA und um 2 – 10°C bei der Hybridisierung mit RNA. Dieser Effekt tritt besonders stark beim Einsatz kurzer Oligonukleotide, wie dies bei 5'-Nukleasesonden der Fall ist, zutage. Der Einsatz von LNA-Nukleotiden kann auch für die Erkennung der Abweichung einzelner Basen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) erfolgen, da die Differenz der Schmelztemperaturen (ΔT_m) bei einer einzelnen Nukleotidabweichung beim Einsatz von LNA-Nukleotiden deutlich höher ist als bei konventionellen DNA Oligomeren (ORUM, 1999). Weitere Eigenschaften, die LNAs für einen Einsatz in diagnostischen Verfahren interessant machen sind ihre relativ einfache

Synthetisierbarkeit, ihre hohe Stabilität und die fehlende Toxizität (ARORA et al, 2008).

2.11 Impfung

In Wirtschaftsgeflügelbetrieben werden aufgrund der Möglichkeit zur Herdenimpfung zumeist Lebendimpfstoffe der Stämme Hitchner B1 und LaSota (HANSON & BRANDY, 1955) sowie deren Klone eingesetzt, die mittels Spray- oder Trinkwasserverfahren appliziert werden. Auch der Klon 2C des lentogenen Stamms chicken/Northern Ireland/Ulster/67 wird als Lebendvakzine vermarktet. Für den Einsatz bei Puten ist lediglich der Stamm LaSota zugelassen.

Die Erstimpfung von Wirtschaftsgeflügel mit klassischen Lebendvakzinen erfolgt nach Empfehlungen der Hersteller zwischen dem ersten und dem 14. Lebenstag. Ein Immunisierungsschema zum Aufbau einer ununterbrochenen protektiven Immunität ist in Tab 1 aufgeführt (BEHR et al, 2008). Bei Legehennen und Elterntieren erfolgen demnach bis zum Eintritt in die Produktionsperiode drei Nachimmunisierungen, wobei diese zum Teil in Kombination mit anderen Impfungen (Infektiöse Bronchitis, Infektiöse Bursitis, aviäres Reovirus sowie Adenovirusinfektionen bei Legehennen) vorgenommen wird. Während der Produktionsperiode ist im Abstand von zehn Wochen zu reimmunisieren.

Tab 5 Empfohlenes Impfschema für Newcastle Disease Virus (nach BEHR et al, 2008)

Lebenswoche	Legeelternherden	Mastelternherden	Legeherden	Broiler
2.	X	X		X
3.			X	
5.	X	X	X	
12.	X	X	X	
17.			X	
18.	X	X	X	
Produktion	Nachimmunisierung im Abstand von 10 Wochen			

Des Weiteren werden Impfstoffe aus inaktiviertem Virusmaterial kommerziell vermarktet. In Deutschland werden diese verstärkt bei der Impfung von Tauben eingesetzt, es sind aber auch inaktivierte Impfstoffe für Wirtschaftsgeflügel erhältlich. Eine Impfung mit inaktivem Antigen bringt die Notwendigkeit einer Einzeltierimpfung

mittels Injektion sowie des Einsatzes von Adjuvanzen mit sich. Zudem findet lediglich eine lokale Reaktion statt, aus der keine IgA Antwort hervorgeht. Allerdings garantiert die inaktivierte Impfung eine länger andauernde Immunität, so dass bei der Anwendung bei Legehennen von einem protektiven Schutz über die gesamte Legeperiode auszugehen ist (GALLILI & BEN-NATHAN, 1998).

Die Anwendung und Qualitätskontrolle von Impfstoffen ist sowohl auf nationaler als auch auf europäischer Ebene durch das Europäische Arzneibuch sowie die Entscheidung 93/152/EWG gesetzlich geregelt. Diese schreibt für attenuierte NDV-Lebendimpfstoffe einen intracerebralen Pathogenitätsindex von unter $0,4 \text{ pro } 10^7 \text{ EID}_{50}$ und unter $0,5 \text{ pro } 10^8 \text{ EID}_{50}$ vor. Die Überprüfung der Impfstoffsicherheit ist durch eine Belastungsinfektion am 21. Lebenstag mit dem velogenen Stamm Herts (Weybridge 33 / 56) vorgeschrieben.

Die Verantwortung des Nachweises des Impferfolges ist in der Geflügelpest-Verordnung in der Fassung vom 20. Dezember 2005 geregelt und liegt bei dem Geflügelproduzenten. Er erfolgt serologisch durch Ermittlung der Antikörpertiter mittels Hämagglutinationshemmungstest (HAH) oder enzymverstärkten Assays (ELISA).

2.12 In-ovo Infektionen und Impfungen

In zunehmendem Masse wird bei der Impfung von Wirtschaftsgeflügel der Einzeltierimpfung im embryonierten Hühnerei Interesse entgegengebracht. Diese sollen eine zuverlässige und gleichmässige Übermittlung des Impfstoffes und frühen Immunschutzes gewähren (NEGASH et al, 2004). Gleichzeitig wird die Kontamination der Umwelt durch grosse Mengen vernebelten Lebendvirus vermindert.

Der Impfzeitpunkt wird durch den Immunstatus des Embryo, dessen Empfänglichkeit für das Virus und wirtschaftliche Faktoren bestimmt, üblicherweise wird der Zeitpunkt der Umlage der Bruteier zum Schlupf am 18. Lebenstag gewählt.

Zur maschinellen Routineanwendung kam die in ovo Impfung bisher beim Aufbau eines sehr frühen Immunschutzes gegen Gallines Herpesvirus 2 (Mareksche Krankheit) (JOHNSTON et al, 1997) zum Einsatz. Im Vergleich zur Impfung gegen die Mareksche Krankheit, die üblicherweise am ersten Lebenstag per

intramuskulärer Applikation erfolgt, wird die Anzahl der Ausfälle bei in ovo Impfung deutlich verringert. Nach der Anwendung bei Puten ist eine Immuntoleranz und Generalisierung der Infektion mit persistierender Virämie beschrieben (RAUTENSCHLEIN et al, 1999).

Weiterhin konnte nach in ovo Immunisierung gegen das Virus der Infektiösen Bronchitis sowie der Infektiösen Bursitis (Gumboro Krankheit) der Nachweis eines frühen, effektiven Immunschutzes erbracht werden (AVIAKIN, 2000; COLETTI, 2001; NEGASH, 2004; WAKENELL & SHARMA, 1986).

Auch für die Impfung gegen Newcastle Disease wurden experimentelle Ansätze zur embryonalen Impfung entwickelt. Bei der Vakzination von Hühner- und Putenembryonen mit klassischen Impfstämmen manifestierte sich eine Restvirulenz, die zum Tod der Embryonen und somit zu deutlich reduzierten Schlupfraten führte (AHMAD & SHARMA, 1992, 1993; DILAVERIS, 2007; MAST, 2006).

Daher wurden alternative experimentelle Protokolle entwickelt, die auf der Basis attenuierter Lebendviren (AHMAD & SHARMA, 1992), inaktivem Virusmaterial (STONE et al, 1997), rekombinanten Pockenviren (KARACA et al, 1998; RAUTENSCHLEIN et al, 1999), rekombinanten Adenoviren (PEROZO et al, 2008a) sowie Rekombinanten aus Newcastle Disease Virus und aviärem Influenzavirus (STEEL et al, 2008) basieren. Weiterhin wurden klinische Untersuchungen mit multivalenten Impfstoffen, die Newcastle Disease als eine der Komponenten beinhalteten, durchgeführt (GAGIC et al, 1999; SHARMA et al, 2002). Alle bisher geprüften in ovo Impfstoffe bewirkten entweder vermehrte Ausfälle und verminderte Schlupfraten, lieferten eine unvollständige protektive Immunität, so dass es nach einer Belastungsinfektion zu Ausfällen kam oder konnten die Ausscheidung von Virus nach einer Belastungsinfektion nicht verhindern. Die klassische Lebendimpfung gegen NDV in den ersten Lebenstagen konnte daher bislang nicht ersetzt werden. Eine kommerzielle Vermarktung von in ovo Impfstoff gegen NDV wurde in Form eines attenuierten Lebendimpfstoffes des Stammes NDW vorgenommen, der Impfstoff wurde aber aufgrund von Restvirulenz, die sich in reduzierten Schlupfraten niederschlug, vom Markt genommen (DILAVERIS et al, 2007).

DILAVERIS et al (2007) zeigten eine Ausscheidung des Impfvirus, welche die zugestellten Sentineltiere zu infizieren und bei diesen eine protektive Immunität zu induzieren vermochte. Deshalb wird eine in ovo Impfung von wenigen Einzeltieren

propagiert, was die Verluste durch die Restvirulenz der Impfung reduziert, jedoch trotzdem die Immunisierung der gesamten Herde gewährleisten soll.

Die Manifestation einer in ovo Infektion und Beobachtungen einer substantiellen Restvirulenz wurden nicht nur experimentell, sondern auch auf natürlichem Weg beobachtet. Eine vertikale Transmission aviären Paramyxovirus wird diskutiert (LANCASTER et al, 1963), wobei vermutet wird, dass sowohl Impfstämme als auch velogene Stämme aus Ausbrüchen auf die Hühnerembryonen übertragen werden können (CHEN & WANG, 2002; RASZEWSKA et al, 1964). Es wird angenommen, dass es bei einer natürlichen Infektion der Elterntiere mit Newcastle Disease Virus zwar zu einer Infektion der Hühnerembryonen, jedoch nicht zum Schlupf infizierter Küken kommt (ALEXANDER, 1997). FRENCH et al (1967) berichten jedoch von der Isolation von lentogenem Virus aus geschlüpften, embryonal infizierten Tieren. Auch POSPISIL et al (1991) zeigten mittels Virusisolierung aus Organen geschlüpfter Tiere eine Infektion mit dem NDV Impfstamm La Sota, welche auf eine embryonale Infektion zurückzuführen ist. Demnach wird postuliert, dass ein Schlupf infizierter Tiere unter bestimmten Umständen möglich ist. CAPUA et al (1993) führten den Nachweis von velogenem Virus aus primären Hühnerembryozellen, die von einer nachweislich infizierten Elterntierherde stammen. Der Schlupf von mit velogenen Stämmen infizierten Küken ist jedoch als Ausnahme anzusehen (CHEN & WANG, 2002).

2.13 Brut und Immunitätsentwicklung

Das Hühnerei hat eine Bebrütungsdauer von 21 Tagen, die sich in der kommerziellen Kunstbrut in die Vorbrut bis zum 18. Bebrütungstag und die anschließende Schlupfbrut untergliedert.

Nach vollständiger Ausbildung des Chorions am 7. bis 8. Bebrütungstag und der Allantoismembran am 10. Bebrütungstag besteht eine Verwachsung der beiden Häute zur Chorioallantoismembran, die unmittelbar der Schalenhaut anliegt. Diese Membran umgibt Dotter- und Eiweissack und bildet die Allantoishöhle, die die embryonalen Ausscheidungen aufnimmt. Auch die Versorgung des Embryos mit Sauerstoff findet durch den Gasaustausch im Bereich der Luftkammer über den ab

dem 5. Bebrütungstag funktionellen Allantoiskreislauf statt (RÜSSE & SINOWATZ, 1998). Der Embryo ist von der Amnionmembran umgeben, die ektodermaler Herkunft ist und die Amnionhöhle bildet. Eine Kommunikation der Allantois- mit der Eiweisshöhle und ein Abschlucken von Eiweiss kann ab dem 11. Bebrütungstag beobachtet werden.

Am 19. bis 20. Bebrütungstag veröden die Allantoisgefässe und der Embryo stösst in die Luftkammer durch, wo ab diesem Zeitpunkt die Versorgung mit Sauerstoff über die Lungenatmung gewährleistet ist (SCHWARZE, 1979). Als Besonderheiten des Immunsystems geschieht bei Hühnern die Reifung der B-Lymphozyten von einem eigens angelegten Organ, der Bursa fabricii, während die Reifung der T-Lymphozyten analog zum Säugetier vom Thymus übernommen wird. Während zunächst von einer Entwicklung der Hämatopoese von Dottersack ausgehend ausgegangen wurde, zeigten Chimärenexperimente, dass diese ab dem 5. Bebrütungstag von Anlagen der ventralen Aorta übernommen wird. Lediglich die frühe Hämatopoese vor dem Einsetzen der Funktion des embryonalen Herzens unterliegt dem Dottersack. Auch die erste Generation der Makrophagen entwickelt sich aus den hämatopoetischen Zellen des Dottersacks. Die Funktion der Hämatopoese wird im Laufe der Embryonalentwicklung von Zellgruppen, die ventral an die Aorta anliegen, übernommen (FELLAH et al, 2007). Zellen aus dem ventral der Aorta liegenden Mesenchym (paraaortische Foci) sind auch für die erste Besiedelung des Thymus zwischen dem sechsten und neunten Inkubationstag verantwortlich (DUNON et al, 1998, 1999; zitiert bei FELLAH et al, 2007). Die T-Zell Vorläufer der beiden weiteren Besiedlungsphasen des Thymus (vom 12. bis 15. Bebrütungstag sowie vom 18. Bebrütungstag bis zum Schlupf) werden in Gegensatz dazu aus dem Knochenmark rekrutiert. Die Besiedelung des Knochenmarks erfolgt ebenfalls in einer ersten Welle aus den paraaortischen Foci (LeDOURAIN et al, 1984; zitiert bei FELLAH et al, 2007) für eine weitere Besiedlungsphase ab dem 10,5. Bebrütungstag werden hämatopoetische Stammzellen in der Allantois produziert.

Die Besiedelung der Bursa findet im Gegensatz hierzu in einem kontinuierlichen Vorgang zwischen den Bebrütungstagen acht und 14 statt. Auch die B-Zell Vorläufer stammen aus den paraaortischen Foci und dem Knochenmark. Eine Produktion von Immunglobulinen beginnt am 14 Bebrütungstag in der Form von IgM. Der Nachweis von aviärem IgY produzierenden Zellen hingegen konnte erst zum Zeitpunkt des

Schlupfs geführt werden, wobei erst ab dem 4. Tag nach Schlupf IgY tragende Zellen ausserhalb der Bursa nachgewiesen werden konnten.

Die Entwicklung des Immunsystems des Gastrointestinaltraktes läuft in zwei Phasen ab. Direkt nach dem Schlupf ist im Vorderdarm (BAR-SHIRA & FRIEDMAN, 2006) und im Meckelschen Divertikel (OLAH & GLICK, 1984; OLAH et al, 1984) eine extramedulläre Granulopoese zu beobachten. In den kaudalen Darmabschnitten hingegen findet die Einwanderung von Granulozyten in einem kontinuierlichen Anstieg vom Zeitpunkt des Schlupfs bis zum siebten Lebenstag statt. Dies lässt eine Granulozyten-stimulierende Wirkung der bakteriellen Besiedelung des Darms vermuten (BAR-SHIRA & FRIEDMAN, 2006).

MAST & GODDEERIS (1999) ermittelten mit ihren Untersuchungen die Entwicklung der Immunkompetenz durch die altersabhängige Induktion von Antikörpern gegen bovines Serumalbumin in sehr jungen Masthühnern. Eine Immunisierung mit bovinem Serumalbumin (BSA) in ovo und subkutan direkt nach dem Schlupf vermochte nicht, nachweisbare Antikörper zu induzieren. Auch nach einer zusätzlichen subkutanen Zweitimpfung im Alter von vier Wochen war kein Antikörperanstieg messbar. Erst bei subkutaner Erstimmunisierung am 7. Lebenstag wurde eine humorale Immunantwort und die Produktion spezifischer Antikörper induziert. Daraus schliessen die Autoren eine vollständige Reifung des Immunsystems erst ab dem 7. Lebenstag (MAST & GODDEERIS, 1999). Auch bei oraler Immunisierung mit bovinem Serumalbumin konnte eine Reifung des gastrointestinaltrakt-assoziierten Immunsystems („gut-associated lymphoid tissue“ – GALT) während der ersten zwei Lebenswochen gezeigt werden. Hier waren spezifische Antikörper erst ab einer Immunisierung am 10. Lebenstag nachzuweisen. (BAR-SHIRA et al, 2003). In den lymphatischen Geweben des GALT fanden sich zum Zeitpunkt des Schlupfes ausschliesslich unreife B- und T- Lymphozyten.

3. Material und Methoden

3.1 Medien und Puffer

Isotonische Kochsalzlösung

Natriumchlorid (Fa. Roth, Karlsruhe)	42,5 g
Aqua bidest	Ad 5000 ml
pH 7,2-7,4	

Zellkulturmedium ZB5

MEM Hanks (Fa. Sigma)	5,32 g
MEM Earle (Fa. Gibco)	4,76 g
NaHCO ₃ (Fa. Roth)	1,52 g
Natriumpyruvat (Fa. Fluka)	0,12 g
NEAS (Fa. Biochrom)	10 ml
FKS 10%	100 ml
Reinstwasser	auf 1000 ml
pH 7,2	
Begasung mit CO ₂ : 2,5 %	

Antibiotika-Stammlösung

Penizillin	10.000 IE
Streptomycin	10 mg
Gentamicin	0,25 mg
Mycostatin	5.000 Einheiten
Aqua bidest	ad 1 ml

Trenngelpuffer

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) 18 g

(Fa. Roth, Karlsruhe)

Aqua bidest.

ad 100 ml

pH 8,8

Trenngel (10%)

Aqua bidest. 5 ml

Acrylamid Stammlösung (Rotiphorese 4 ml

Gel 30, Fa. Roth, Karlsruhe)

Trenngelpuffer 3 ml

SDS 20% (Fa. Roth, Karlsruhe) 60 µl

Tetramethylethyldiamin (TEMED) 8 µl

Ammoniumpersulfat 10% (Fa. Roth, 100 µl
Karlsruhe)

Sammelgelpuffer

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) 9 g

(Fa. Roth, Karlsruhe)

Aqua bidest.

ad 100 ml

pH 6,8

Sammelgel

Aqua bidest.	4 ml
Acrylamid Stammlösung (Rotiphorese Gel 30, Fa. Roth, Karlsruhe)	1 ml
Sammelgelpuffer	1 ml
SDS 20% (Fa. Sigma-Aldrich, München)	30 µl
Tetramethyldiamin (TEMED) (Fa. Sigma-Aldrich, München)	4 µl
Ammoniumpersulfat 10% (Fa. Roth, Karlsruhe)	100 µl

Laufpuffer

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (Fa. Roth, Karlsruhe)	3,02 g
Glycin (Fa. Sigma-Aldrich, München)	14,4 g
SDS 20% (Fa. Roth, Karlsruhe)	5 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml

Coomassie

Coomassie Brilliant Blue (Fa. AppliChem, Darmstadt)	48 mg
Methanol (Fa. Roth, Karlsruhe)	50 ml
Eisessig (Fa. Roth, Karlsruhe)	200 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Entfärber

Methanol (Fa. Roth, Karlsruhe)	100 ml
Eisessig (Fa. Roth, Karlsruhe)	150 ml
Aqua bidest.	ad 2000 ml

Fixierer

Methanol (Fa. Roth, Karlsruhe)	200 ml
Glycerin (Fa. Roth, Karlsruhe)	50 ml
Eisessig (Fa. Roth, Karlsruhe)	37,5 ml
Aqua bidest.	ad 500 ml

Western Blot Puffer

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	6,05 g
(Fa. Roth, Karlsruhe)	
Glycin (Fa. Sigma-Aldrich, München)	28,13 g
Methanol (Fa. Roth, Karlsruhe)	500 ml
Aqua bidest	ad 2500 ml

Ponceau S

Eisessig (Fa. Roth, Karlsruhe)	1 ml
Ponceau S (Fa. Sigma-Aldrich, München)	0,2 ml
Aqua bidest.	ad 100 ml

PBS

Natriumchlorid NaCl (Fa. Roth)	8,006 g (1,40M)
Kaliumchlorid KCl (Fa. Roth)	0,201 g (0,027M)
Natriumhydrogenphosphat	1,424 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (Fa. Roth)	
Kaliumhydrogenphosphat KH ₂ PO ₄	0,204 g
Aqua bidest (Fa. Roth)	ad 1000 ml

pH 7,4	
--------	--

PBS-Tween (0,1%)

Tween 20 (Fa Sigma-Aldrich)	10 ml
PBS	ad 10000 ml

Magermilch für Western Blot

Magermilchpulver	1 g
PBS-Tween (0,1%)	ad 50 ml

FACS Puffer

FKS	0,5 ml
0,25% NaN ₃	2,5 ml
Na ₂ EDTA	5 ml
PBS	ad 500 ml

TBE (Tris Borate EDTA) Buffer Disodium, Fa. Amresco

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	10,78 g (89mM)
Borat	5,50 g (89mM)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	0,58 g (2mM)
Reinstwasser	Ad 1000 ml
pH 8,2-8,4	

TE (Tris EDTA) Puffer

TRIS HCl	500 µl 1M (10mM)
EDTA	100 µl 0,5M (1mM)
Aqua bidest	49,4 ml (ad 50ml)
pH 8,0	

RSB50 (RNA-Safe-Buffer) (nach HOFFMANN et al, 2006)

Carrier polyA-RNA (RNA-Homopolymer, 50 µl	
Fa. Amersham Biosciences, Freiburg),	
10 µg / µl	
Tween 20 (Fa. Sigma-Aldrich, München), 100 µl	
5%	
Natriumazid, 5%	100 µl
RNAse freies Wasser	ad 10 ml

NDV M - Mix FAM

Primer Wise M 4100Fw (100 pmol/µl)	20 µl
Primer Wise M 4200Rev (100 pmol/µl)	20 µl
Sonde Wise M 4169FAM (100 pmol/µl)	12 µl
0,1 x TE (pH 8,0)	148 µl (ad 200 µl)

Endkonzentration: Primer 1: 10 pmol/ µl
 Primer 2: 10 pmol/µl
 Sonde: 6 pmol/µl

Primer und Sonde NDV M (nach WISE et al, 2004)

Primer	Sequenz	T _m (°C)
M+4100	5'-AGTGATGTGCTCGGACCTC-3'	51
M-4220	5'-CCTGAGGAGAGGCATTGCTA-3'	54
M+4169	5'-[FAM]TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC[TAMRA]-3'	67,98

Primer NDV NP

Primer	Sequenz	T_m (°C)
NDVnp-54F	5'-GY ¹ ACGGGTAGAAGGTGTGA-3'	57,7
NDVnp-166R	5'-CTGAGCM ² GCD ³ AGGAGCTG-3'	60,1
NDVnp-1066F	5'-TGACAGYGACCAGATGAGCTT-3'	58,8
NDVnp-1119F	5'-TTGCCATGGGYATGGCATC-3'	57,7
NDVnp-1231R	5'-CCTGAGCCTGAGCRTACTC-3'	59,9
NDVnp-1236R	5'-CTTCCCTGDGCCTGAGC-3'	58,4
NDVnp-1251R	5'-TCR ⁴ TTRATGCTACTTCCCTG-3'	55,3

¹ C oder T , ² A oder C, ³ A oder G oder T, ⁴ A oder G

Sonden NDV NP

Sonde	Sequenz	Länge (Basen)
NDVnp-1184-FAM	5'-[FAM]-ATGAGCACATCATTCTGGAGACTYG-[BHQ1]-3'	25
NDVnp1184-FAMv2	5'-[FAM]-ATGAGYACATCATTYTGGAGACTYGG-[BHQ1]-3'	26
NDVnp1184-FAMas	5'-[FAM]-CCRAGTCTCCARAATGATGTRCTCAT-[BHQ1]-3'	26
NDVnp-LNA1-FAM	5'-[FAM]-ACA ¹ TCATTYT GG AGACT-[BHQ1]-3'	17
NDVnp-LNA2-FAM	5'-[FAM]-ACAT C ATTYT GG YACT-[BHQ1]-3'	17
NDVnp-LNA3-FAM	5'-[FAM]-ACAT C ATTYT GGM GACT-[BHQ1]-3'	17

¹ die fett gedruckten Buchstaben stehen für den Ersatz konventioneller Nukleotide durch LNA-Basen.

3.2 Virus

Als Impfvirus wurde der aus dem Rückenmark eines Graupapageien isolierte Virusstamm APMV 599 verwendet. Es handelte sich um die vierte Hühnereipassage aus dem Originalmaterial.

Als Challengevirus wurde der im Europäischen Arzneimittelbuch zur Überprüfung von Lebendimpfstoffen gegen die Newcastle Disease vorgeschriebenen Stamm Herts (Weybridge 33 / 56) verwendet. Es handelt sich um einen von der Firma Intervet zur Verfügung gestellten und einmal auf embryonierten Hühnereiern passagierten Stamm.

Zur Beimpfung der LaSota Kontrollgruppe (Kap. 3.4.2) wurde der Lebendimpfstamm Clone 30 (Nobilis® ND Clone 30, Fa. Intervet), der einmalig auf embryonierten Hühnereiern passagiert wurde, eingesetzt.

Zur Validierung der *Real-Time* RT-PCR wurden der Taubenstamm R151/94 (Genotyp VI), der 2006 aus Enten isolierte Stamm R2479/06 (Genoklasse 1) sowie die Stämme Herts (Weybridge 33 / 56) und Clone 30 (Nobilis® ND Clone 30, Fa. Intervet) verwendet.

Die betreffenden Virusstämme wurden zur Erstellung eines Virusstocks einmal gemäss der Vorgaben des Anhangs der EU-Richtlinie 92/66/EWG auf bebrüteten Hühnereiern passagiert. Hierzu wurden 9 bis 11 tägige embryonierte Hühnereier (Fa. Lohmann Tierzucht, Cuxhaven) über der Luftkammer desinfiziert und die Schale perforiert. Mit einer 22G Kanüle wurden die Schalenhaut und die Chorioallantoismembran durchstoßen und 0,2 ml Virus in die Allantoishöhle appliziert. Die Allantoisflüssigkeit wurde nach Absterben der Eier geerntet, auf seine hämagglutinierenden Eigenschaften hin überprüft und zu einem Virusstock zusammengefasst. Es erfolgte ebenfalls eine Überprüfung auf bakterielle Kontamination sowie auf Kontamination durch aviäre Influenzaviren.

Die Ermittlung der eiinfektiösen und eilethalen Dosis 50 (EID₅₀ bzw. ELD₅₀) wurde durch Titration auf embryonierten Hühnereiern ermittelt. Dazu wurde infektiöse Allantoisflüssigkeit in den Verdünnungen 10⁻² bis 10⁻¹⁰ auf 9- bis 11-tägige embryonierte Hühnereier verimpft. Aus der Anzahl der abgestorbenen bzw. infizierten Eier wurden EID₅₀ und ELD₅₀ anhand der Methode nach REED und

MUENCH (1938) errechnet. Der Virusstock wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert und einmalig zur Verwendung aufgetaut .

3.3 PCR (Polymerase Chain reaction)

Neben der Verwendung eines validierten und publizierten Real-Time RT-PCR Protokolls, welches als Zielgen einen Abschnitt des Matrixproteingens nutzt wurde ein weiteres Protokoll neu entwickelt, welches einen Abschnitt des Nukleoproteingens als Zielgen für die Amplifikation nutzt.

3.3.1 Aufbereitung des Organmaterials

Es erfolgte eine automatische RNA-Extraktion des Organmaterials aus dem durchgeführten Tierversuch (Kap 3.4) mittels Silicamembrantechnologie.

Zunächst wurden Organstücke von jeweils ca. 30 mg Gewicht unter sterilen Bedingungen mit 400 µl RA1 Guanidin-Isothiocyanat Extraktionspuffer (NucleoSpin 96 RNA Kit, Fa. Macherey-Nagel, Düren) und einer Edelstahlkugel vom 5mm Durchmesser (Werkstoffnr. 1.3541, Fa. Isometall, Pleidelsheim) versetzt, anschliessend wurde das Gewebe 2 min bei 30 r/s mechanisch zerkleinert (QiaShredder, Fa. Qiagen, Hilden). Nach Zentrifugation wurde aus dem Überstand mittels eines Hamilton MICROLAB STAR® eine automatische RNA-Extraktion per Silikamembrantechnologie durchgeführt. Als Kontaminationskontrolle wurde nach der Verarbeitung der Organe jedes Individuums eine Negativkontrolle mitgeführt.

Bei verzögerter Bearbeitung der Proben wurden die in RA1 Puffer zerkleinerten Organe bei -70°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert, um eine Degradation der RNA zu vermeiden.

Die im 96-Loch Plattenformat extrahierte RNA wurde mit AlumaSeal® Aluminiumfilm (Fa. EXCEL Scientific, Wrightwood, CA, US) abgeklebt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Bearbeitung der extrahierten RNA erfolgte parallel mit beiden PCR Protokollen, um eine durch wiederholtes Einfrieren und Tauen verursachte Degradation der RNA zu vermeiden.

3.3.2 Aufbereitung des Tupfermaterials

Die entnommenen Kloakentupfer zur Ermittlung der Ausscheidung wurden in 2 ml ZB5-Zellkulturmedium verbracht. Anschliessend wurden 140 µl der Suspension in 600 µl RL Puffer (Fa. Macherey & Nagel, Düren), einem mit Träger-RNA versetzten Guanidin Isothiocyanant Puffer, verbracht. Die RNA Extraktion erfolgte automatisch per Silicamembrantechnologie mittels eines Hamilton MICROLAB STAR® Extraktionsroboters.

Bei verzögerter Bearbeitung wurden das in Zellkulturmedium suspendierte Tupfermaterial vor Zugabe des RL Puffers bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C gelagert, um eine Degradation der Träger-RNA durch Einfrieren und Tauen zu vermeiden. Die im 96-Loch Platten Format extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.3 RNA Extraktion mit Viral RNA Mini Kit

Für die manuelle RNA Extraktion aus Allantoisflüssigkeit und suspendiertem Tupfermaterial wurde der Viral RNA Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden) gemäss der Herstellerangaben verwendet:

- Versetzen von 140 µl des Probenmaterials (Allantoisflüssigkeit bzw. in Zellkulturmedium suspendiertes Tupfermaterial) mit 560 µl mit Träger-RNA versetztem AVL-Puffer (Guanidin Thiocyanat)
- 10 min Inkubation bei Raumtemperatur.
- Zugabe von 560 µl 96% Ethanol
- Verbringen von 630 µl der Probe auf eine QiaAmp Mini Säule zur Adsorption and die Silikamembran
- Zentrifugation 1 min bei 8000 rpm (6000 x g).
- Waschen mit 700 µl Waschpuffer AW1, Zentrifugation 30 sec bei 8000 rpm
- Waschen mit 500 µl AW2, Zentrifugation 2 min bei 13000 rpm.
- Elution der RNA von der Membran mit 70 µl AVE Puffer, 1 min Inkubationszeit, Zentrifugation 1 min bei 8000 rpm

Die extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Verdünnung aller RNA-Präparationen erfolgte in RNA-stabilisierendem Puffer (RSB50) (HOFFMANN et al, 2006). Allantoisflüssigkeiten wurden zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen einzeln aufgearbeitet.

3.3.4 Analyse von PCR-Produkten im Agarosegel

Zur Analyse der PCR-Produkte aus der klassische PCR oder zur Überprüfung spezifischer Amplifikation und Sondenbindung in der Real-Time PCR wurden die Produkte mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Für kurze Fragmente von unter 200 Basenpaaren Länge wurde ein 3,5%, für längere Fragmente (200-1000 Basenpaare) ein 1,5% Agarosegel verwendet. Hierfür wurden 1,75 g, bzw. 0,75 g Agarose (Fa. Amresco, Solon, OH) eingewogen und mit TBE-Puffer auf eine Masse von 50 g aufgefüllt. Nach Lösen der Agarose durch Erhitzen in der Mikrowelle (ca. 2 min) wurde die verdampfte Masse mit Aqua bidest auf 50 g aufgefüllt. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C wurden 5 µl Ethidiumbromid zugegeben und das Gel für ca. 60 min in einem Geltray mit Kamm (Fa. BioRad, München) ausgehärtet. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Fa. BioRad, München) in einem TBE-Puffersystem (30 min, 100 V, 300 mA; Power Supply Power Pac Basic, Fa. BioRad, München).

3.3.5 RRT-PCR nach Wise et al. (2004)

Bei der ersten eingesetzten RRT-PCR handelte sich um das validierte und USDA-zertifizierte Protokoll nach WISE et al. (2004) wobei in Abweichung zum publizierten Protokoll kein RNase Inhibitor eingesetzt wurde. Die Real-Time PCR nach WISE et al. (2004) wurde als One-Step Protokoll unter Zuhilfenahme des One-step RT-PCR Kits (Fa. Qiagen, Hilden) angewandt. Der Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 20 µl setzte sich aus den in Tab. 6 aufgeführten Komponenten zusammen.

Es wurden Primer eingesetzt, die ein 184 bp grosses Fragment amplifizieren. Die Sonde von 24 Basenpaaren Länge ist am 5' Ende mit FAM als Fluorophore und am 3' Ende mit TAMRA als Quencher markiert. Alle Primer und Sonden wurden von der Fa. Operon, Köln synthetisiert. Es wurde ein Primer-Sonden-Gemisch aus den Primern M+ 4100 und M- 4220 in Konzentrationen von jeweils 10 pmol / µl sowie der

Sonde M+ 4169 in einer Konzentration von 6 pmol / μl in 0,1 x TE-Puffer hergestellt, das in den nachfolgenden Reaktionen eingesetzt wurde (Kap 3.1 Medien und Puffer).

Tab. 6 Komponenten des Mastermix (modifiziert nach WISE et al, 2004)

Mastermix-Komponente	Volumen pro Ansatz
RNAse freies H ₂ O	10,95 μl
5 x PCR buffer	5,0 μl
dNTP-Mix	0,8 μl
MgCl ₂	1,25 μl
Enzym-Mix	1,0 μl
NDV-M-Mix-FAM	1,0 μl
Template RNA	5,0 μl

Der Mastermix wurde in einer 96-Loch RRT-PCR Platte (Fa. nerbe plus, Winsen) in Aliquots von 20 μl vorgelegt, anschliessend wurden 5 μl Proben-RNA pro Ansatz zugegeben. Als Negativkontrollen wurde in jeder zweiten Reihe eine Wasserkontrolle mitgeführt, als Positivkontrolle diente RNA des APMV-Stammes 472, die auf einen cT Wert von 30 eingestellt wurde. Dies entsprach einer Verdünnung von 10^6 der aus Allantoisflüssigkeit extrahierten RNA.

Die Durchführung der RRT-PCR wurde auf einem Stratagene Mx3000P Real-Time Cycler (Fa. Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn) nach dem in Tab. 7 angeführten Temperaturprofil vorgenommen.

Tab. 7 Temperaturprofil der RRT-PCR Reaktion

Durchgeführter Schritt	Zeit	Temperatur	
Reverse Transkription	30 min	50°C	
Aktivierung der Taq Polymerase	15 min	95°C	
Denaturierung	10 sec	94°C	40 Zyklen
Anlagerung	30 sec	52°C	
Finale Elongation	10 sec	72°C	

Zur Fluoreszenzmessung wurde ein Filterset mit einer Exzitationswellenlänge von 492 nm und einer Emissionswellenlänge 516 nm (FAM-Filter set) eingesetzt. Die Auswertung wurde mit den Einstellungen „Amplification based threshold“, „Adaptive baseline“ sowie „Moving average smoothing“ vorgenommen.

3.3.6 Entwicklung einer RRT-PCR auf dem NP-Proteingen

Zusätzlich zum oben genannten PCR-Protokoll wurde eine Methode entwickelt, die als Zielgen das für NP-Protein kodierende Gen nutzt. Die Entwicklung setzte sich aus den Arbeitsschritten Primersequenzauswahl, Sondensequenzauswahl, Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen sowie Sondenoptimierung zusammen.

3.3.6.1 Primerauswahl

Zunächst wurde ein Set von drei Vorwärts- (*Forward*) und vier Rückwärts- (*Reverse*) Primern ausgewählt (Kap 3.1 Medien und Puffer). Ein Vorwärts- und ein Rückwärts-Primer nutzen als Target eine Region, die am Beginn des für NP codierenden Gens liegt (Position 54 bis 166) sowie zwei *Forward*- und drei *Reverse*-Primer, die am Ende der für NP codierenden Genregion liegen (Position 1066 bis 1251). Alle Primer wurden von der Fa. Operon, Köln, synthetisiert.

Zunächst wurde mit einem Panel von vier repräsentativen, auf Genomebene stark unterschiedlichen APMV-Stämmen - Clone 30 (Impfstamm, Genotyp II), Herts (Weybridge 33 / 56) (velogener Stamm, Genotyp IV), R151/94 (Taubenstamm, Genotyp VIb) sowie R2594/06 (Entenstamm, Genoklasse I) - die optimale Primerkombination gewählt. Hierfür wurde der SYBR Green RT-PCR Kit der Firma Qiagen, Hilden eingesetzt, dessen Fluoreszenz durch Anlagerung des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green® an doppelsträngige DNA frei wird. Die Komponenten der PCR sind in Tab. 8 dargestellt, die Reaktionsbedingungen sind in Tab. 9 angeführt. Die Exzitationswellenlänge der Fluoreszenzmessung betrug 492 nm, die Emissionswellenlänge 516 nm (SYBR Filter set). Die Auswertung wurde mit den Einstellungen „Amplification based threshold“, „Adaptive baseline“ sowie „Moving average smoothing“ vorgenommen.

Tab. 8 Eingesetzte Komponenten des Mastermix für die NP-PCR

Mastermix-Komponente	Volumen / Ansatz (µl)
SYBR-Mastermix	12,5 µl
Primer 1 (20pmol/µl)	1 µl
Primer 2 (20pmol/µl)	1 µl
RT-Mix	0,25 µl
RNAse freies H ₂ O	5,25 µl
Template RNA	5 µl

Tab. 9 Temperaturprofil der RRT-PCR auf dem NP-Proteingen

Durchgeführter Schritt	Zeit	Temperatur
Reverse Transkription	30 min	50°C
Aktivierung der Taq Polymerase	15 min	95°C
Denaturierung	30 sec	95°C
Annealing	30 sec	55°C
Finale Elongation	30 sec	72°C

40 Zyklen

Die Spezifität der Fluoreszenz wurde mittels Schmelzkurvenanalyse überprüft.

Hierbei wurden die Schmelztemperaturen (T_m) der Proben durch einen graduellen Anstieg der Temperatur von 25°C auf 95°C bei gleich zeitiger Messung der Fluoreszenz ermittelt.

Weiterhin wurden die PCR Produkte zur Ermittlung spezifischer Amplifikation und Ausschluss von Fluoreszenz durch Bildung von Primerdimeren in einem 3,5% TBE Agarosegel aufgetragen. Aus diesen Ergebnissen wurde die Primerkombination ausgewählt, die alle vier Stämme sicher erfasste und dabei den niedrigsten cT Wert aufwies.

Anschliessend wurde durch Schachbrett titration die optimale Primerkonzentration für Vorwärts- und Rückwärtsprimer ermittelt. Auch hierfür wurde der SYBR Green RT-PCR Kit (Fa. Qiagen, Hilden) verwendet. Die Primer wurden in den Verdünnungen 5 pmol bis 30 pmol pro Ansatz eingesetzt.

3.3.6.2 Sondenauswahl und -optimierung

Nach Ermittlung der optimalen Primerkombination und -konzentration wurde eine spezifische Sonde ausgewählt. Die Synthetisierung der Sonden erfolgte durch die Fa. Eurogentech, Köln. Zunächst wurde eine 5' Nukleasesonde (TaqMan) von 25 Basen Länge (Position 1184-1209 auf dem NP-Gen) eingesetzt, die am 5' Ende mit FAM als *Fluorophore* und am 3' Ende mit BHQ1 als *Quencher* markiert ist. Diese wurde mit den vier repräsentativen Stämmen und den ermittelten Primern untersucht. Anschliessend wurden die Fluoreszenzeigenschaften der Sonde mit folgenden Modifikationen überprüft:

- Verlängerung der ursprünglichen TaqMan Sondensequenz um eine Base
- Ersetzen zweier Basen durch ein definiertes Gemisch verschiedener Basen (*Wobbles*)
- Einsatz einer Sonde mit komplementärer Sequenz, die auf dem Antisense-Strang der amplifizierten cDNA bindet.

Zur weiteren Optimierung wurde eine verkürzte Sonde von 17 Basenpaaren Länge entwickelt, bei der sieben Basen durch locked nucleic acid (LNA) Basen ersetzt wurden. Diese LNA-Sonde wurde im Anschluss wie in Kap 3.1 (Sonden NP-PCR) gezeigt durch geringgradige Modifikationen verändert, was zur Ermittlung der finalen Primer- und Sondensequenzen führte. Durch Titration der Sonde (2,5 pmol bis 10 pmol / Ansatz) wurde die optimale Sondenkonzentration ermittelt.

Alle Primer wurden mit 0,1 x TE-Puffer auf eine Arbeitskonzentration von 20 pmol / µl, alle Sonden auf 5 pmol / µl verdünnt.

3.3.6.3 NP-PCR

Nach Auswahl der in Tab. 10 aufgeführten endgültigen Primer und Sondensequenzen wurde die endgültige Zusammensetzung des Reaktionsgemisches ermittelt. Die RRT-PCR wurde als One-Step PCR unter Zuhilfenahme des Quantitec Probe RT-PCR Kits (Fa. Qiagen) durchgeführt (Tab.11)

Tab. 10 Finale Auswahl der Primer und Sonde

Primer Name	Sequenz
NDVnp-1066F	TGACAGYGACCAGATGAGCTT
NDVnp-1231R	CCTGAGCCTGAGCCTACTC
NDVnp-LNA3-FAM	5'-[FAM]-ACA ¹ TCATTYT GGM GA CT -[BHQ1]-3'

¹ LNA Basen

Tab. 11 Eingesetzte Komponenten des Mastermix für die NP-PCR

Mastermix-Komponente	Volumen / Ansatz
5x PCR Buffer	12,5 µl
Primer 1066F	1,0 µl
Primer 1231R	1,0 µl
Sonde NDVnp-LNA3-FAM	0,8 µl
RT-Mix	0,25 µl
SDW	4,45 µl
Template RNA	5,0 µl

Der Mastermix wurde in einer 96-Loch Platte (Fa. NerbePlus) in 20 µl Volumina vorgelegt, anschliessend wurden pro well 5 µl Proben RNA hinzugefügt. Als Negativkontrollen wurde pro 15 Proben eine Wasserkontrolle mitgeführt.

Die Amplifikation wurde über 40 Zyklen mit dem in Tab. 12 aufgeführten Temperaturprofil durchgeführt. Es wurde ein Filterset mit einer Exzitationswellenlänge von 492 nm und einer Emissionswellenlänge 516 nm (FAM-Filter set) eingesetzt.

Tab. 12 Temperaturprofil der NP RRT-PCR

Durchgeführter Schritt	Zeit	Temperatur	
Reverse Transkription	30 min	50°C	
Aktivierung der Taq Polymerase	15 min	95°C	
Denaturierung	30 sec	95°C	40 Zyklen
Annealing	30 sec	55°C	
Finale Elongation	30 sec	72°C	

3.3.6.4 Auswertung und statistische Analyse der Ergebnisse

Die Ergebnisse der RRT-PCR Protokolle wurde mit den Softwareeinstellungen „Amplification Based Threshold“, „Adaptive Baseline“ sowie „Moving Average Smoothing“ vorgenommen. Ergebnisse wurden als positiv gewertet, wenn sie einen cT-Wert von weniger als 35 aufwiesen. Die Untersuchungen galten als valide, wenn alle Negativkontrollen unter diesem Wert lagen sowie die cT Werte der beiden PCR-Protokolle eine Differenz von <3 cT Werten aufwiesen.

Den ermittelten Ergebnissen wurde in Abhängigkeit des cT Werts ein semiquantitativer Index zugeordnet (Tab. 13). Anschliessend wurde der Durchschnitt aus den Einzelwertungen der beiden PCR-Protokolle ermittelt, so dass die semiquantitative Auswertung Index-Werte zwischen 0,5 und 3 zuliess.

Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit R 2.7.0 (R Development Core Team, 2008).

Um eine Prädilektion des Virus für bestimmte Organe über die ersten acht Lebenstage festzustellen wurden zunächst die Indexwerte aller Organe deskriptiv verglichen. Mittels eines multiplen Vergleichs (Kruskal-Wallis-Test) wurde geprüft, ob statistisch signifikante Unterschiede der Viruslast zwischen den Organen vorlagen. Um zu ermitteln, zwischen welchen Organen statistisch signifikante Unterschiede bestehen, wurden anschliessend paarweise Vergleiche mit Hilfe des exakten *Wilcoxon* Rangsummentests (*Mann-Whitney-Test*) durchgeführt. Alle statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe von Dr. M. Ziller, FLI Wusterhausen, durchgeführt.

Tab. 13 Semiquantitative Wertung der PCR Ergebnisse

cT-Wert	Semiquantitative Wertung
>35	0 - Negativ
30-35	1 - Schwach positiv
25-30	2 - Positiv
<25	3 - Stark positiv

3.4 Tierversuch

3.4.1 Vorversuch

Zunächst wurde für den Stamm APMV 599 in einem Vorversuch die optimale Beimpfungsdosis in ovo durch Titration ermittelt. Die Orientierung erfolgte an der Impfdosis für Lebendimpfstoffe des Geflügels, die mit 10^6 EID₅₀ pro Tier angegeben wird. In Anlehnung daran erfolgte eine Beimpfung mit einer Dosis von 10^4 , 10^5 und 10^6 EID₅₀ in die Allantoishöhle. Beimpft wurden jeweils 20 Eier.

Direkt nach dem Schlupf wurde die Schlupfrate erfasst. Bei allen geschlüpften und ungeschlüpften Tieren wurden die Organe CAM (bei ungeschlüpften Tieren) bzw. Haut (bei geschlüpften Tieren), Leber, Drüsenmagen, Duodenum mit Pankreas und Lunge steril entnommen. Die Untersuchung auf die Präsenz viraler RNA erfolgte parallel mittels der in Kap. 3.3.5 und 3.3.6.3 angeführten Real-Time RT-PCR Protokolle. Als infiziert wurden Tiere gewertet, die in CAM / Haut und mindestens einem weiteren Organ einen cT-Wert unter 35 aufwiesen.

3.4.2 In ovo Infektion

Alle durchgeführten Tierversuche waren genehmigungspflichtig und wurden unter der Tierversuchsgenehmigung des Ministeriums für Ernährung, Landwirtschaft, Forsten und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern mit dem Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-015/07 durchgeführt.

Zur Durchführung des Tierversuchs wurden spezifisch pathogenfreie (spf) Tiere der Rasse Lohmann White Leghorn (Fa. Lohmann Tierzucht, Cuxhaven) verwendet. Die Tiere wurden aus befruchteten Eiern erbrütet.

Die Inokulation der Bruteier erfolgte am 18. Bebrütungstag in die Allantoishöhle, alle Eier wurden mit einem Volumen von 0,2 ml beimpft. 120 der Bruteier wurden mit 10^6 eiinfektiösen Dosen 50 (EID₅₀) des APMV-1 Stammes 599 beimpft, die geschlüpften Tiere werden im Folgetext als „Versuchsgruppe“ bezeichnet (Abb. 4).

Weitere 90 Bruteier derselben Charge, aus denen die Kontroll- (60 Eier) und Sentinelgruppen (30 Eier) rekrutiert wurden, wurden mit 0,2 ml steriler isotonischer Kochsalzlösung beimpft.

Zur Überprüfung der abgeschwächten Pathogenität des APMV-Stammes 599 wurde als Kontrolle eine Gruppe von 60 Eiern mitgeführt, die mit der ersten Passage eines

kommerziellen NDV Lebendimpfstoffs (NOBILIS® ND Clone 30, Fa. Intervet) beimpft wurden. Diese wurden mit einer Dosis von 10^4 EID₅₀ beimpft. Dies geschah zeitlich versetzt, so dass auch hier die Schlupfrate mittels einer zeitgleich bebrüteten uninfizierten Kontrollgruppe von 40 Eiern derselben Charge ermittelt wurde.

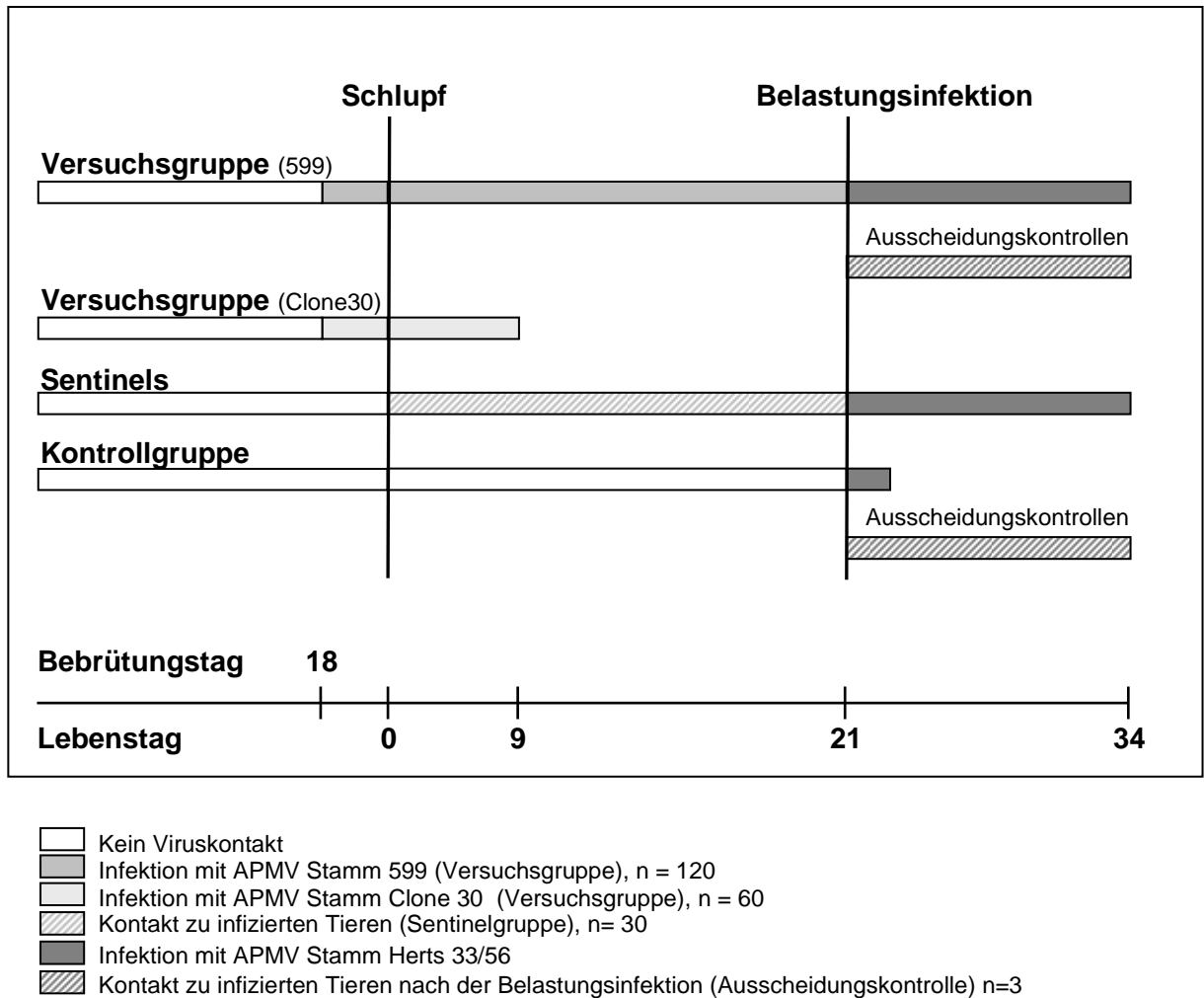


Abb. 4 Schema der Versuchstiergruppen sowie Zeitpunkt des Viruskontaktes.

Die Beimpfung der Versuchsgruppen erfolgte am 18. Bebrütungstag in die Allantoishöhle. Die in ovo Beimpfung erfolgte am 18. Bebrütungstag. Die schraffierten Flächen symbolisieren einen passiven Viruskontakt durch die Ausscheidungen der infizierten Tiere. Am 21. Lebenstag wurden die Tiere einer Belastungsinfektion unterzogen.

3.4.3 Brut und Haltung

Die Vorbrut erfolgte bis zum 18 Bebrütungstag bei 37,5°C und 55% Luftfeuchtigkeit (Vorbrüter „Sofie 3“, Fa. Hemel Brutgeräte, Verl). Die Sentinelgruppe schlüpfte gemeinsam mit der Versuchsgruppe während die Kontrollgruppen bis zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion gesondert gehalten wurde. Direkt im Anschluss daran erfolgte die Umlage zur Schlupfbrut, die bis zum Schlupf am 21. Bebrütungstag bei 37,5°C und 70-80% Luftfeuchtigkeit erfolgte.

Die Schlupfbrut sowie der Schlupf der Versuchsgruppe erfolgte getrennt von der Kontrollgruppe in einem Isolierstallgebäude mit Unterdruck und HEPA-Luftfilterung unter L2 Sicherheitsbedingungen. Direkt nach Abschluss des Schlupfes wurden die 96 geschlüpften Tiere der Versuchsgruppe in Überdruckisolatoren (Modell IM 1500, Fa. Montair Andersen B.V., Kronenberg, NL) verbracht und dort bis Abschluss des Versuchs gehalten. Die Innenmasse der Isolatoren betrugen 80 x 150cm und waren mit einer Wärmelampe von 150W sowie einer Stülp- und einer Nippeltränke ausgestattet. Die Luftfilterung erfolgte über eine Umwälzpumpe mit HEPA-Luftfiltern. Am zweiten Lebenstag wurde die Gruppe zur Vermeidung von Überbesatz geteilt und auf zwei Isolatoren verteilt gehalten.

Die Sentinelgruppe setzte sich zusammen aus 16 Tieren, die zusammen mit der Versuchsgruppe schlüpften, sowie 10 weiteren Tieren, die am ersten Lebenstag zu der Gruppe gesetzt wurden. Aufgrund des einheitlichen klinischen Bilds wurden diese zwei Gruppen im Folgenden als eine „Sentinelgruppe“ zusammengefasst.

In der ersten Lebenswoche erfolgte zur Vermeidung bakterieller Sekundärinfektionen eine Trinkwasserbehandlung mit 0,7 ml / l (entspricht 70 mg / l) Enrofloxacin (Baytril® 10%, Fa. Bayer) gemäss des Vorschlags des Tierarzneimittelkompendiums der Schweiz (www.tierarzneimittel.ch). Die Tiere wurden bis zum Versuchsende ad libitum mit pelletiertem Spezialfutter gefüttert (ssniff Legehühner-Aufzucht, Fa. Ssniff Spezialdtäten, Soest).

Die Tiere wurden täglich im Sinne einer Herdenuntersuchung adspektorisch begutachtet, tote Tiere wurden entfernt und moribunde Tiere wurden tierschutzgerecht getötet. Die pathologisch-anatomische Untersuchung und Probennahme aller toten Tiere erfolgte direkt im Anschluss.

3.4.4 Belastungsinfektion

Am 21. Lebenstag wurden 20 Tiere der Versuchsgruppe, 18 Tiere der Sentinelgruppe sowie jeweils 10 Tiere der Kontrollgruppen einer Belastungsinfektion mit 10^5 eiinfektiösen Dosen 50 (EID_{50}) des velogenen Newcastle Disease Virusstamm Herts (Weybridge 33 / 56) unterzogen. Das Virus wurde intramuskulär in den linken M. tibiotarsalis appliziert.

Die Tierzahlen sowie die Viruslast richteten sich nach den Vorgaben für lyophilisierte Newcastle Disease Virus Lebendimpfstoffe (European Pharmacopoeia, 2007). Belastet wurde mit 10^5 EID_{50} , was 0,2 ml einer 2×10^3 fachen Verdünnung der virushaltigen Allantoisflüssigkeit entsprach.

Zeitgleich wurden sowohl der Versuchs- als auch der Kontrollgruppe jeweils drei ungeimpfte Tiere zugestellt, die keiner Belastung mit dem Challengevirus unterzogen wurden. Diese Tiere dienten zur Überprüfung der Ausscheidung durch die Kontroll- und Versuchsgruppe. Im Anschluss an die Belastungsinfektion wurden die Tiere einer täglichen adspektorischen Kontrolle unterzogen. Tote Tiere wurden aus der Gruppe entfernt und moribunde Tiere wurden tierschutzgerecht getötet. Alle gestorbenen und getöteten Tiere wurden der Probennahme zugeführt.

3.4.5 Probennahme

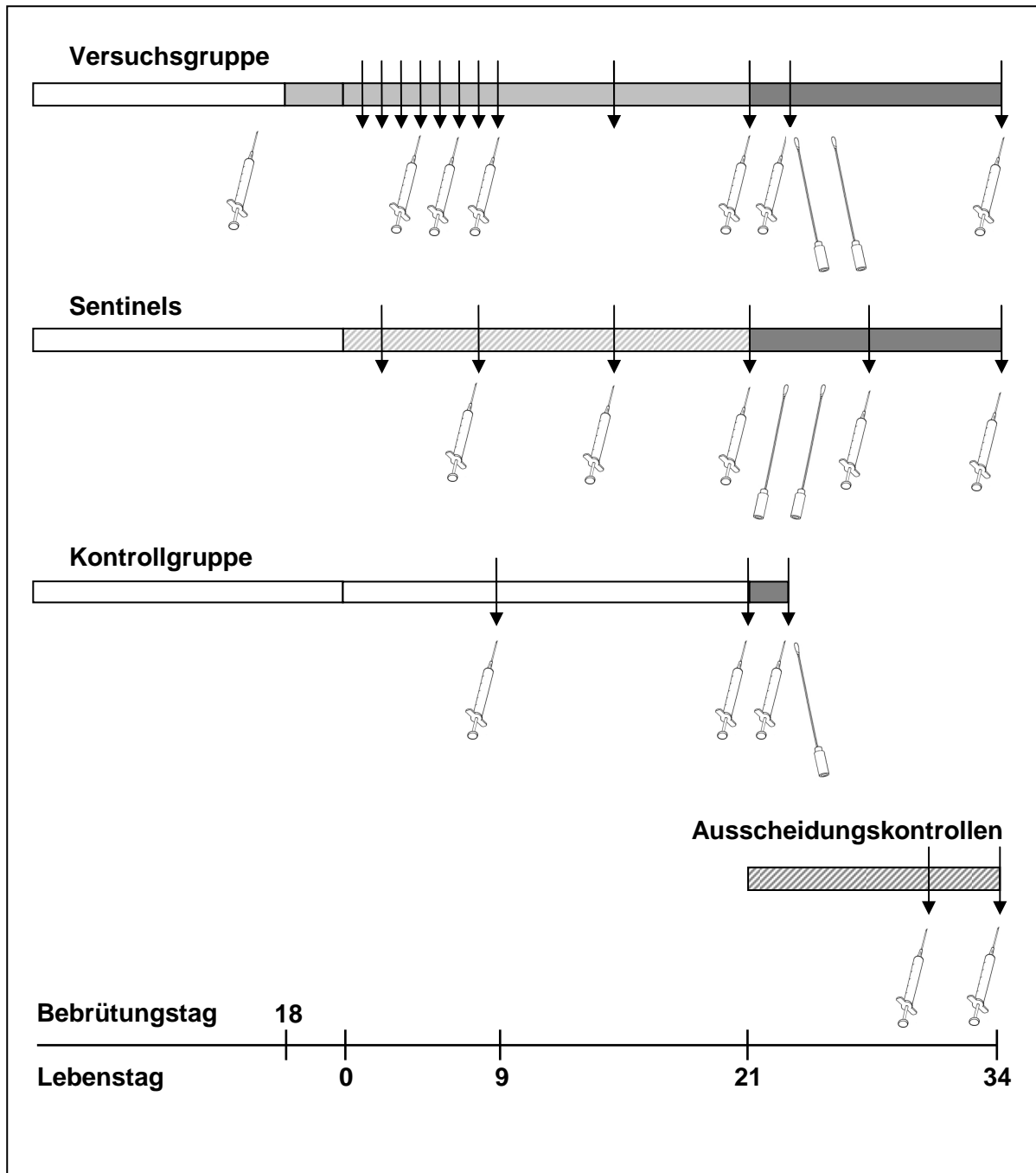
Es erfolgte eine regelmässige Entnahme von Organproben zur Ermittlung des Virustropismus sowie von Blutproben zur Ermittlung des Serostatus. Geplant war die Entnahme von Proben von jeweils fünf Tieren der Versuchsgruppe an den Lebenstagen 1, 2, 4, 7, 14 und 21 sowie drei Tieren am 23. Lebenstag. Weiterhin war die Probennahme von zehn Tieren aus allen Gruppen am Versuchsende geplant.

Zusätzlich wurden moribund getötete sowie gestorbene Tiere an den Tagen 3, 5, 6 und 8 beprobt, alle zusätzlichen Entnahmen erfolgten also im Zuge des spontanen Todes oder Tötens aufgrund klinischer Symptomatik der Tiere (Tab. 14).

Als Zusammenstellung repräsentativer Organe wurden ZNS (Kleinhirn und Stammhirn), Leber, Lunge, Drüsenmagen, Duodenum, Pankreas, Zäkum mit Zäkaltonsille und Kot entnommen. Zum Zeitpunkt der Beprobung wurden die Gewichte der Tiere ermittelt.

Mit der Gewinnung von Blutproben wurde ab dem 4. Lebenstag begonnen. Diese wurden parallel zu den Organproben bei Töten der Tiere gewonnen (BD Vacutainer SSII Advance, Fa. Becton-Dickinson GmbH, Plymouth, UK) Zusätzlich wurden zwei und vier Tage nach Belastungsinfektion Tupferproben (Virocult[®], Medical Wire & Equipment, Corsham, UK) aus der Kloake entnommen, die zur Überprüfung der Virusausscheidung mit dem Kot dienten. Die Organproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert, die Tupferproben wurden mit 2 ml Zellkulturmedium ZB5 versetzt und anschliessend ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Die Schemata der Probennahme sind Abb. 5 zu entnehmen.

Zur Ermittlung des zellulären Immunstatus unmittelbar vor und im Anschluss an die Belastungsinfektion wurden Heparinblutproben von fünf Tieren am 19., 21., 23. und 25. Lebenstag genommen. Aus diesen wurde wie nachstehend beschrieben die Leukozytenfraktion gewonnen und mittels FACS Analyse gemessen (Kap 3.6, Zelluläre Immunantwort).



- Kein Viruskontakt
- Infektion mit APMV Stamm 599 (Versuchsgruppe), n = 120 (Eier)
- Infektion mit APMV Stamm Clone 30 (Versuchsgruppe), n = 60 (Eier)
- Kontakt zu infizierten Tieren (Sentinelgruppe), n= 30 (Eier)
- Infektion mit APMV Stamm Herts 33/56
- Kontakt zu infizierten Tieren nach der Belastungsinfektion (Ausscheidungskontrolle) n=3 (Tiere)

Abb. 5 Schematische Darstellung der Probennahme aus den drei unterschiedlichen Hühnergruppen.

Geplant war die Probennahme von Organen (↓) und Serum (🪡) von jeweils fünf Tieren an den Lebenstagen 1, 2, 4, 7, 14 und 21 sowie am Versuchsende (34. Lebenstag). Alle weiteren Beprobungen fanden aufgrund des Todes der Tiere oder des Tötens aufgrund ausgeprägter klinischer Symptome statt. Zusätzlich wurde die Ausscheidung durch Kloakentupferproben (🪡) 2 und 4 Tage nach Belastungsinfektion evaluiert.

3.5 Serologie

3.5.1 Serumgewinnung

Bei den verwendeten Blutproben handelt es sich um Vollblut, das beim Töten der Versuchstiere zur Probennahme gewonnen wurde. Die Vollblutproben wurden in einem BD Vacutainer SST Advance (Fa. Becton-Dickinson GmbH, Plymouth, GB) gewonnen und laut Herstellerangaben weiter verarbeitet.

Die Blutproben wurden nach einer Inkubationszeit von 30-60min bei Raumtemperatur 4min bei 3500rpm (2000 x g) zentrifugiert und der Überstand in ein Eppendorf Gefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Serumproben bei -20°C gelagert.

3.5.2 Hämagglutinationshemmungstest

Die gewonnenen Seren wurden 30 min bei 56°C inaktiviert und anschliessend in einen Hämagglutinationshemmungstest (HAH) eingesetzt. Der HAH wurde nach den Vorgaben des „Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals“ der Organisation Internationale des Epizooties (O.I.E., 2008) folgendermassen durchgeführt:

- Die Seren wurden mittels eines Doppelansatzes getestet.
- Vorlegen von 25 µl 0,9% Kochsalzlösung (pH 7,0 – 7,4) in eine 96-Loch Mikrotiterplatte (Fa. Greiner).
- Vorlegen von 25 µl des zu testenden Serums in die Vertiefungen der obersten Reihe.
- Anlegen einer Verdünnungsreihe von von 1 log₂ (1:2) bis zu einer Verdünnung von 11 log₂ (1:2048)
- Zugabe von 25 µl des Antigens NDV Clone 30 pro Vertiefung, eingestellt auf vier hämagglutinierende Einheiten.
- Inkubation der Platte für 30 min bei Raumtemperatur.
- Zugabe von 25 µl einer 1% Hühnerythrozytensuspension pro Vertiefung.
- Inkubation der Platte für 30 min bei Raumtemperatur.

Als Kontrollen wurden eine Erythrozytenkontrolle (ohne Serum, ohne Antigen), sowie eine Serumkontrolle (ohne Antigen) mitgeführt, die eine Autoagglutination der

Erythrozyten bzw. eine unspezifische Agglutination durch das eingesetzte Serum ausschliessen sollen.

Das Ablesen des Tests erfolgte in einem Winkel von 45°, als Hämagglutination wurde gewertet, wenn die Erythrozyten nicht oder nur stark verzögert ablaufen.

Die Ergebnisse werden in \log_2 Stufen angegeben, wobei 1 einer Serumverdünnung von 1:2 und 11 einer Serumverdünnung von 1:2048 entspricht.

3.5.3 ELISA

Die gewonnenen Seren wurden weiterhin mittels eines kommerziellen ELISAs für Wirtschaftsgeflügel (Hühner) auf die Präsenz von spezifischen Antikörpern hin untersucht. Bei dem verwendeten ELISA handelt es sich um den ELISA Kit recNDV der Fa. Labordiagnostik Leipzig, der als plattengebundenes Antigen ein rekombinantes Virushüllprotein verwendet. Der Test wurde gemäss der Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern und Sekundärantikörpern folgendermassen durchgeführt:

- Die Seren wurden mittels einer Doppelbestimmung getestet.
- Einsetzen von 100 µl einer 1:500 Verdünnung der Seren pro Vertiefung.
- 30 min Inkubation bei Raumtemperatur.
- Dreimaliges Waschen der Platte mit dem mitgelieferten Waschpuffer
- 30 min Inkubation mit 100 µl eines Anti-IgY-HRP Konjugats bei Raumtemperatur
- Dreimaliges Waschen der Platte mit dem mitgelieferten Waschpuffer
- 10 min Inkubation bei Raumtemperatur mit 100 µl pro Vertiefung des TMB-Substrates
- Abstoppen der Reaktion mit 100 µl Stopplösung
- Messen der optischen Dichte (OD) der Vertiefungen bei einer Wellenlänge von 650 nm gemessen.

Als Kontrollen dienten die mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen sowie eine Konjugatkontrolle, anhand der die Hintergrundreaktivität ohne Serum bestimmt wurde.

Die gemessenen OD-Werte wurden wie folgt ausgewertet:

- Bestimmen des Mittelwerts aus den OD-Werten der Positivkontrollen und der Negativkontrollen
- Subtrahieren des OD-Mittelwertes der Negativkontrolle vom OD-Mittelwert der Positivkontrolle sowie den OD Werten der Proben
- Berechnung des s/p-Quotienten der Proben nach folgender Formel:

$$s/p = \frac{\text{Absorption des Messwerts} - \text{Absorption der Negativkontrolle}}{\text{Absorption der Positivkontrolle} - \text{Absorption der Negativkontrolle}}$$

Proben mit OD-Werten unter 0,2 wurden als negativ, Proben mit OD-Werten zwischen 0,2 und 0,3 als fraglich und Proben mit OD-Werten über 0,3 als positiv bewertet.

3.5.4 Western Blot

Die Seren, die bei der Untersuchung mittels ELISA und Western Blot eine fragliche Reaktivität zeigten wurden mittels Western Blot nachuntersucht. Bei dem hierfür auf den Streifen verwendeten Antigen handelte es sich um den NDV Stamm Clone 30, der mittels Ultrazentrifugation aus infektiöser Allantoisflüssigkeit aufgereinigt wurde und dessen Proteine anschliessend wie unten beschrieben mittels SDS-PAGE in einem Acrylamidgel aufgetrennt wurden.

3.5.4.1 Aufreinigung von Virionen mittels Ultrazentrifugation

Etwa 500 ml infektiöser Allantoisflüssigkeit aus mit NDV Clone 30 beimpften Eiern wurde gepoolt und in einer Ultrazentrifuge (Sorvall Discovery, Fa. Thermo, Langenselbold) 30 min bei 4000 rpm zentrifugiert (Rotor: A621). Das formierte Zellpellet wurde verworfen und der Überstand weitere 4 min bei 20'000 rpm und 4°C unter Vakuum zentrifugiert (Rotor: A621). Das entstandene Viruspellet wurde in ca. 3 ml PBS bis zur vollständigen Lösung resuspendiert.

Ein 30% bis 60% Saccharosegradient wurde in klaren Ultrazentrifugenröhrchen gegossen und baute sich über 12 h bei 4°C auf. Das resuspendierte Viruspellet wurde 16 Stunden bei 27'000 rpm über den Gradienten aufgereinigt (Rotor: Surespin 630).

Die im Saccharosegradienten sichtbaren Banden wurden in getrennten Fraktionen abgenommen und deren Dichte wurde densitometrisch gemessen. Zur Entfernung des Saccharoseanteils wurde die Fraktion in einem Verhältnis von mindestens 1:5 mit PBS verdünnt und das Virus für 1,5 Std bei 27'000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in dem kleinstmöglichen Volumen (ca. 2 ml) PBS resuspendiert. Die so gewonnenen Virusfraktionen wurde 30 min bei 56°C inaktiviert und hinsichtlich ihres Virusanteils elektronenmikroskopisch untersucht. Die Fraktion mit dem höchsten Virus- und geringsten Zellbestandanteil wurde zur weiteren Verwendung ausgewählt. Anschliessend wurde deren Proteingehalt nach Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Fa. Bio-Rad, München) gemäss der Herstellerangaben ermittelt.

3.5.4.2 SDS-PAGE

Als Antigen wurde Vollvirus des mittels Ultrazentrifugation aus infektiöser Allantoisflüssigkeit aufgereinigten Stammes NDV Clone 30 eingesetzt. Dessen Proteine wurden zunächst mittels Natriumdodecylsulfat - Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI et al (1970) aufgetrennt und anschliessend mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran geblottet.

Die Auftrennung der sieben Struktur- und Nichtstrukturproteine erfolgte unter reduzierenden Bedingungen in einem 10% Polyacrylamid Gel von 10 x 10 cm Grösse. In die Kammern eines vertikalen Gelelektrophoresesystems (Fa. Peqlab, Erlangen) wurden erst das Trenngel, anschliessend das Sammelgel nach der in Kap 3.1 (Medien und Puffer) angeführten Rezeptur gegossen. Die Polymerisationszeit des Trenngels betrug 60 min, die des Sammelgels 30 min. Als Kamm wurde ein präparativer Kamm verwendet.

Das eingesetzte Virus wurde mit PBS auf eine Konzentration von 500 µg / ml verdünnt, anschliessend in einem Verhältnis von 1:1 auf eine Endkonzentration von 250 µg / ml mit reduzierendem Laemmli-Puffer (Fa. Sigma-Aldrich, München) verdünnt. Eine Inkubation von 5 min bei 99°C (eppendorf Thermomixer compact,

Eppendorf, Hamburg) gewährleistete die Dissoziation und Denaturierung der Disulfidbrücken der viralen Proteine.

In die Tasche des präparativen Kamms wurden 32,5 µg Protein eingesetzt, was einem Volumen von 130 µl bei einer Proteinkonzentration von 250 µg / ml entspricht. Als Proteinmarker wurde der prestained Protein Marker IV der Fa. Peqlab mitgeführt, der zehn vorgefärbte Banden bei Proteingrößen zwischen 10 und 170 kDa aufweist. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 220 mA bei variabler Spannung bis zum Erreichen der unteren Gelkante durch die Laufbande (ca. 60 min) mit Hilfe eines „Power Supply EV261“ (Fa. Peqlab, Erlangen) durchgeführt. Die Überprüfung des gleichmässigen Laufes erfolgte anhand des mitgeführten Markers.

3.5.4.3 Western Blot

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden anschliessend mittels *semi-dry* Western Blot auf eine Nitrozellulose-Blottingmembran (Porengrösse 0,45 µm, Fa. Peqlab, Erlangen) geblottet.

Das Polyacrylamidgel und die Nitrozellulosemembran wurden in Blotpuffer angefeuchtet und zwischen zwei ebenfalls in Blotpuffer befeuchtete Filterpapiere (Whatman Gel Blotting Paper, GB003, 0,8mm, Fa. Whatman, Maidstone, UK) in der Reihenfolge Anode – Filterpapier – Nitrocellulose – Polyacrylamidgel – Filterpapier – Kathode in eine Blotkammer (PerfectBlue „Semi-Dry“ Elektrobloetter SEDEC M, Fa. Peqlab, Erlangen) geschichtet. Anschliessend wurde für 60 min eine konstante Spannung von 280 V bei einer Stromstärke von 40 mA angelegt (Power Supply Peqlab EV261, Fa. Peqlab, Erlangen). Als Indikator für erfolgreiches Blotten diente die Übertragung des angefärbten Proteinmarkers auf die Nitrocellulosemembran.

Die Nitrocellulosemembran wurde in 2% Ponceau S Lösung verbracht, 2 min unter Schütteln inkubiert und auf das Vorhandensein aller Proteinbanden überprüft. Nach drei Waschschritten mit PBS, um den Farbstoff von der Membran zu entfernen, wurde die Nitrocellulosemembran 60 min in 1% Magermilchpulver geblockt. Anschliessend wurde die Membran gut abgetrocknet und in Streifen geschnitten. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Das Polyacrylamidgel wurde nach dem Blotten mittels Coomassie-Färbung auf Proteinreste hin untersucht. Hierfür wurde das Gel über Nacht in einer Coomassie-Lösung (Kap. 3.1 Medien und Puffer) inkubiert, anschliessend 60 min

oder bis zum kompletten Entfärben des Hintergrunds bei Erhaltung der Bandenfärbung in Entfärberlösung unter Schütteln inkubiert und nach 60 min Inkubation unter Schütteln im Trockenpuffer zwischen zwei Cellophanblättern (Fa. Roth, Karlsruhe) getrocknet.

Die Streifen wurden mit 3 ml eines 2% Magermilch-Puffers rehydriert, anschliessend erfolgte die Zugabe der zu testenden Serumproben in einer Endverdünnung von 1:250. Als Positivkontrolle wurde Serum eines immunisierten Huhnes mitgeführt. Es wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Abkleben der Platten und Inkubation über Nacht bei 4°C zur Bindung der Antikörper.
- Waschen der Streifen, 3 x 5 min mit PBS - 0,1% Tween
- 30 min Inkubation bei Raumtemperatur mit peroxidasemarkiertem (POD) α -chicken IgG Antikörper (Antikörper aus dem Kaninchen, Fa. Sigma Aldrich, München), Verdünnung 1:10'000 (2 ml / Streifen)
- Waschen der Streifen, 3 x 5min mit PBS - 0,1% Tween
- 5 min Inkubation bei Raumtemperatur mit Super Signal West Pico Chemoluminescence Substrate (Fa. Pierce, Rockford, IL), 70 μ l / Streifen
- Streifen gut abtropfen lassen
- Entwicklung auf Amersham Hyperfilm MP (Fa. Amersham Biosciences, Piscataway, US) Röntgenfilm, Belichtungsdauer von 10 und 30 sec.
- Entwicklung von Hand, 60 sec entwickeln, waschen des Röntgenfilms in klarem Wasser, 60 sec fixieren. Anschliessend ausgiebiges Waschen des Röntgenfilms unter fliessendem Wasser und gut abtropfen lassen.

Die Beurteilung der Western Blot Ergebnisse erfolgte qualitativ nach vollständigem Trocknen des Röntgenfilms.

3.6 Zelluläre Immunantwort

Zur Ermittlung der zellulären Immunität wurde der Lymphozytenstatus zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion untersucht. Am Tag der Belastungsinfektion sowie zwei und vier Tage nach Belastungsinfektion und am Versuchsende (Tag 13 nach Belastungsinfektion) wurden jeweils fünf Hühner individuell hinsichtlich ihrer T- und

B-Zellantwort sowie ihrer antigenpräsentierenden Zellen untersucht. Die Aufreinigung und Markierung der Lymphozyten aus 5 ml heparinisiertem Vollblut wurde nach folgendem Protokoll vorgenommen:

- Zentrifugation des heparinisierten Vollbluts für 10 min bei 1100 rpm (Zentrifuge: Hettich Universal 320 R)
- Abnehmen von ca. 1,5 ml Buffy coat und Verdünnung mit 3,5 ml mit EDTA versetztem PBS
- Zentrifugation für 40 min bei 1800 rpm über 5 ml Ficoll
- Abnehmen der Interphase und Verdünnung in 5ml PBS
- Zentrifugation für 10 min bei 1100 rpm
- Zellen zählen,
- Inkubation von 1×10^6 Zellen (ca. 50 μ l) für 20 min mit der in Tab. 14 aufgeführten fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern aus der Maus, jeweils auf 100 μ l FACS Puffer (Kap. 3.1) verdünnt.
- Auffüllen der Röhrchen auf 2 ml mit FACS Puffer
- Waschen durch Zentrifugation für 10 min bei 1100 rpm, Überstand abgiessen
- Pellet in 300 μ l Puffer aufnehmen
- Messung mittels FACS (FACSCalibur, Fa. Beckton-Dickinson, Erembodegem, B)

Tab. 14 Eingesetzte monoklonale Antikörper zur Detektierung der Lymphozytenfraktionen.

Antikörper	Markierung	Verdünnung	Erkannte Zellen
α -CD4	Phycoerythrin (PE),	1:200	T-Helferzellen
α -CD8	Fluorescein Isothicyanat (FITC),	1:100	Cytotoxische Zellen
α -Bu1A	Fluorescein Isothicyanat (FITC),	1:200	B-Zellen
α -MHCII	Phycoerythrin (PE),	1:50	Andere antigenpräsentierende Zellen

Die Messung und Auswertung der Lymphozytenanteile erfolgte mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie (FACS) der markierten Zellen durch Frau Dr. U Blohm, Institut für Infektionsmedizin, FLI Insel Riems. Die Ausgabe erfolgte in prozentualen Anteilen an der gesamten Lymphozytenpopulation.

4. Ergebnisse

4.1 Entwicklung eines Real-Time PCR Protokolls

4.1.1 Primer- und Sondenauswahl

Zunächst galt es, eine geeignete Primerkombination zur Amplifikation eines Abschnitts des NP-Proteingens auszuwählen. Hierzu wurden sieben Kombinationen der in Kap 3.1 (Medien und Puffer) aufgeführten NP-Primer anhand von vier repräsentativen Stämmen evaluiert. Die Wertung erfolgte anhand der Stärke der spezifischen Banden der im 3,5% Agarosegel aufgetragenen PCR-Produkte, wobei mit der Primerkombination 1066F / 1231R eine deutliche Bande des Amplifikats aller vier Stämme zu sehen war (Tab. 15). Die angeführte Beurteilung erfolgte semiquantitativ nach folgenden Kriterien:

- ++ deutliche Bande im Agarosegel
- + schwache Bande im Agarosegel
- keine Bande im Agarosegel

Die optimale Primerkombination aus den sieben getesteten Kombinationen fiel auf die Primer 1066F und 1231R, die eine Sequenz von 165 Basenpaaren von Position 1066 bis Position 1231 des Gesamtgenoms amplifizieren.

Tab. 15 Amplifikation eines spezifischen Fragments des NP-Proteingens mit den sieben untersuchten Primerkombinationen.

	54F/166R	1066F/1231R	1066F/1236R	1066F/1251R	1119F/1231R	1119F/1236R	1119F/1251R
Herts 33	++	++	++	++	+	+	-
2594/06	-	++	++	-	-	+	-
151/94	-	++	++	++	-	+	-
Clone 30	++	++	-	++	-	-	+
NTC	-	-	-	-	-	-	-

Im Anschluss an die Primerauswahl wurde eine 5'-Nuklease (TaqMan) Sonde eingesetzt, um die amplifizierte Sequenz spezifisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Hierfür wurde zunächst eine Sonde mit der Sequenz NDVnp-1184-FAM 5'-[FAM]-ATGAGCACATCATTCTGGAGACTYG-[BHQ1]-3' eingesetzt.

Dabei zeigten sich bei der Amplifikation aller Proben unregelmässige Kurvenverläufe und eine schwache Gesamtfluoreszenz, die auch durch die in Kap. 3.3.6.2 angeführten Modifikationen nicht entscheidend zu verbessern war. Zur Verbesserung der Hybridisierungseigenschaften wurde eine verkürzte Sonde entwickelt, bei der Basen zur verbesserten Bindungseigenschaft durch LNA-Basen ersetzt wurden. Nach der Insertion einer zusätzlichen variablen Base (*Wobble*) an Position 13 der Sonde (A→M) wurde schlussendlich eine Sonde mit der Sequenz NDVnp-LNA3 5'-[FAM]-ACAT**CATTYTGGMG**ACT-[BHQ1]-3', wobei die fett gedruckten Buchstaben für den Ersatz konventioneller durch LNA Basen stehen, eingesetzt. Bei der Untersuchung der beiden im Tierversuch eingesetzten Stämme 599 und Herts (Weybridge 33 / 56) als Repräsentanten eines lentogenen und eines velogenen Stammes unterschiedlicher Genogruppen vergleichend mit beiden Sonden konnte eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzhöhe sowie ein gleichmässigerer Anstieg des Kurvenverlaufs beobachtet werden (Abb 6).

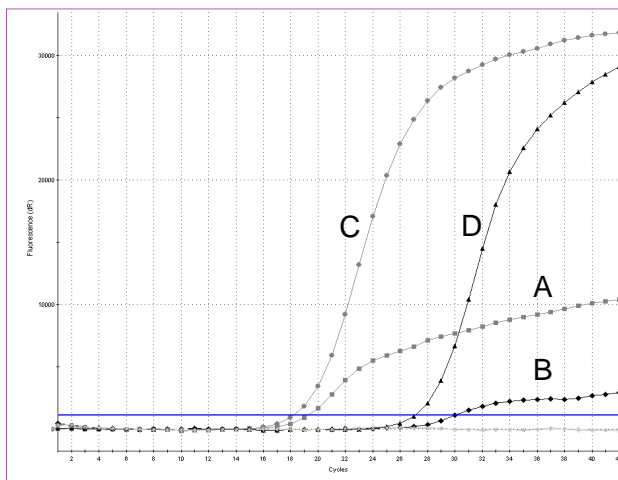


Abb. 6 Kurvenverlauf vergleichend mit TaqMan und LNA Sonde.

Die Abbildung zeigt die Amplifikationskurven der entwickelten Real-Time RT-PCR auf dem NP-Gen der Stämme APMV 599 und Herts (Weybridge 33 / 56) in Abhängigkeit der Sonde. Sowohl APMV 599 (**A, C**) als auch Herts (Weybridge 33 / 56) (**B, D**) zeigen beim Einsatz der LNA Sonde (**C, D**) einen deutlich stabileren Kurvenverlauf bei höherer Fluoreszenz als die TaqMan Sonde (**A, B**).

- | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| A – APMV-1 Stamm 599, | unverdünnte AAF, Sonde NDVnp-1184-FAM |
| B – APMV-1 Stamm Herts 33/56, | unverdünnte AAF, Sonde NDVnp-1184-FAM |
| C – APMV-1 Stamm 599, | unverdünnte AAF, Sonde NDVnp-LNA1-FAM |
| D – APMV-1 Stamm Herts 33/56, | unverdünnte AAF, Sonde NDVnp-LNA1-FAM |

Abschliessend wurde mit den endgültig gewählten Primern NDV NP 1066F und NDV NP 1231R und der Sonde NDV-NP-LNA3 FAM eine Konzentrationsoptimierung durchgeführt. Die Primerkonzentrationen zwischen 10 und 30 pmol wiesen keine deutlichen Abweichungen in cT Wert und Fluoreszenzhöhe auf, so dass die Primerkonzentration von 20 pmol des Vorwärts- und Rückwärtsprimers pro Ansatz gewählt wurde, die die niedrigste Basisfluoreszenz bei erhaltenen cT und Fluoreszenzwerten zeigte (Tab. 16).

Die Sondenkonzentration, die bei gleichbleibender Primerkonzentration von 20 pmol pro Ansatz ermittelt wurde, zeigte bei Konzentrationen zwischen 1,5 und 5 pmol pro Ansatz erwartungsgemäss keine Differenzen der cT Werte. Deutlich war die Abnahme der maximalen Fluoreszenzhöhe ab Sondenkonzentrationen, die 4 pmol pro Ansatz unterschritten. Daher wurde die Konzentration von 4 pmol pro Ansatz als minimale Sondenkonzentration, die den Erhalt des Fluoreszenzplateaus gewährleistete, gewählt (Abb. 7).

Tab. 16 cT Werte bei jeweils gleichbleibender Primer- oder Sondenkonzentration.

Primerkonzentration (pmol / Ansatz)	Sondenkonzentration (pmol / Ansatz)	Ct	maximale Fluoreszenz
30	4	23,62	31186,109
25	4	23,78	30591,019
20	4	24,29	31673,057
15	4	24,41	31346,345
10	4	25,03	30880,428
20	1,5	23,97	16905,701
20	2	23,57	24575,398
20	2,5	23,94	29119,659
20	3	23,88	28070,949
20	4	24,01	31673,057
20	5	23,73	32072,962

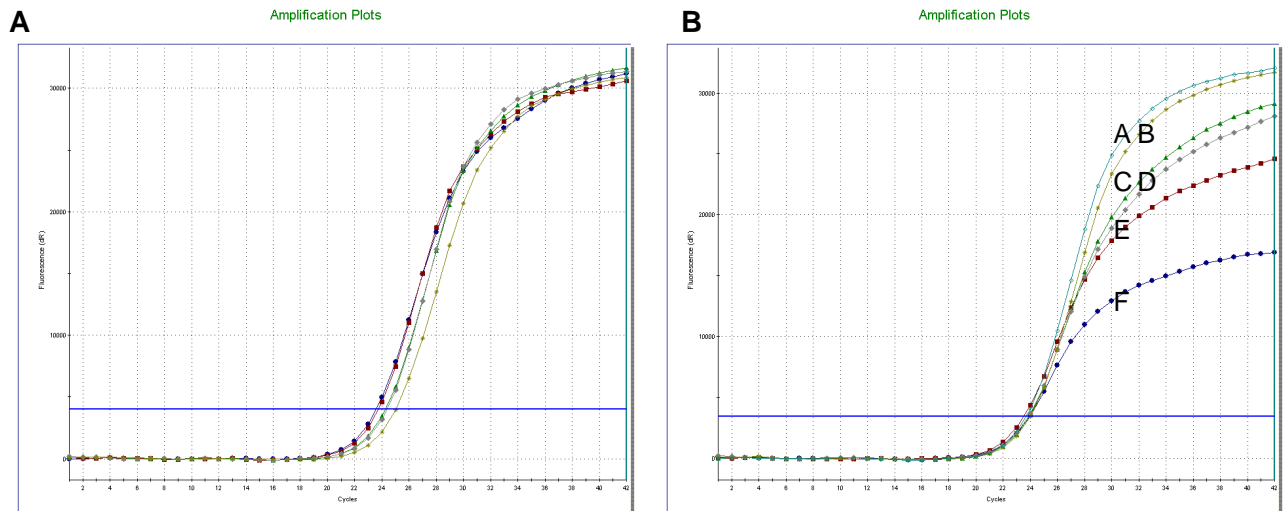


Abb. 7 Ermittlung der optimalen Primer- und Sondenkonzentration.

A – Titration der Primer bei einer gleichbleibenden Sondenkonzentration von 4 pmol pro Ansatz. Eingesetzt wurden Primerkonzentrationen von 10 bis 30 pmol pro Ansatz. Die Ergebnisse unterscheiden sich weder in ihrem cT Wert noch in ihrer Fluoreszenzhöhe massgeblich voneinander, so dass eine Primerkonzentration von 20 pmol gewählt wurde, die die niedrigste Basisfluoreszenz aufwies.

B – Titration der Sonde bei einer gleichbleibenden Primerkonzentration von 20 pmol pro Ansatz. Bei Einsatz von 5 pmol (A) und 4 pmol (B) der Sonde pro Ansatz ist das Erreichen eines Fluoreszenzplateaus zu beobachten, während Konzentrationen von 3 (C), 2,5 (D), 2 (E) und 1,5 pmol (F) eine stetige Abnahme der Fluoreszenzhöhe zur Folge haben. Daher wurde eine Sondenkonzentration von 4 pmol pro Ansatz gewählt.

4.1.2 Bestimmung der Sensitivität

Um einen Anhaltspunkt für die Sensitivität der entwickelten Methode zu erhalten wurde RNA der vier repräsentativen Stämme Clone 30, R2594/06, R151/94 und Herts (Weybridge 33 / 56) in Verdünnungen von 10^3 und 10^6 parallel mit beiden Protokollen untersucht. Die Sonde des neu entwickelten Protokolls war zur spezifischen Detektion von Amplifikaten des NP-Proteingens des Entenisolats R2594/06 imstande, während mit der 5' Nukleasesonde nach WISE et al (2004) keine Fluoreszenz messbar war (Tab.18).

Bei den übrigen Stämmen lagen die cT Werte der beiden Untersuchungen weitgehend im selben Bereich mit maximal einem cT Wert Abweichung voneinander. Lediglich bei der Detektion amplifizierter cDNA, einer Verdünnung von 10^6 der RNA

des Stamms Herts (Weybridge 33 / 56), konnte mit dem Protokoll nach WISE et al (2004) ein cT Wert von 37,19 erzielt werden, während mit dem neu entwickelten Protokoll eine Detektion nicht mehr möglich war (Tab.17).

Tab. 17 Vergleichende Detektion vier repräsentativer Stämme mit beiden für den Tierversuch angewandten RRT-PCR Protokollen.

	Verdünnung Primer (pmol / Ansatz)	Verdünnung Sonde (pmol / Ansatz)	NP, 10 ⁻³	M, 10 ⁻³	NP, 10 ⁻⁶	M, 10 ⁻⁶
Clone 30	20	4	20.79	21.67	29.57	30.47
R2594/06	20	4	33.55	no cT	no cT	no cT
R151/94	20	4	26.54	25.97	35.47	36.70
Herts (Weybridge 33/56)	20	4	28.76	27.62	no cT	37,19

4.2 Tierversuch

4.2.1 Vorversuch

Der Vorversuch hatte zum Ziel, die optimale Impfdosis zur anschliessenden in ovo Beimpfung zu ermitteln. Hierbei sollte die Dosis der höchstmöglichen Infektionsrate ohne Reduktion der Schlupfrate erzielt werden. Die ermittelte eifektiöse Dosis (EID_{50}) des verwendeten APMV-1 599 Virusstocks betrug $10^{9,83}$, die ermittelte eilethale Dosis 50 (ELD_{50}) betrug $10^{6,5}$. Die errechnete EID_{50}/ELD_{50} ist demnach 1,51.

Die Schlupfrate der unbeimpften Kontrolltiere betrug 45% (9 von 20 Tieren) und blieb bei allen eingesetzten Virusdosen von 10^6 , 10^5 und 10^4 EID_{50} konstant. Allerdings starben bei einer Beimpfungsdosis von 10^6 EID_{50} zwei Küken direkt nach dem Schlupf, bei einer Beimpfungsdosis von 10^5 EID_{50} starb eines der geschlüpften Küken. Bei allen ungeschlüpften und während des Schlupfes im Ei steckengebliebenen Tieren war Virus in CAM und einem weiteren Organ nachzuweisen. Auch bei den geschlüpften Tieren, die in ovo eine Dosis von 10^6 EID_{50} des Stamms APMV 599 erhalten hatten, waren alle Tiere infiziert. Die Infektionsrate der geschlüpften, in ovo mit 10^5 und 10^4 EID_{50} beimpften Tiere war dagegen auf 83% (10 von 12 Tieren infiziert) und 88,9% (8 von 9 Tieren infiziert) reduziert (Tab. 18). Im Fall der Küken, die nicht als infiziert gewertet wurden, war zwar in CAM / Haut, jedoch in keinem weiteren Organ virale RNA nachweisbar. Das Virus wurde demnach bei keinem der Tiere während der drei letzten Bebrütungstage vollständig eliminiert.

Es wurde trotz des Todes zweier Tiere direkt nach dem Schlupf eine Dosis von 10^6 EID_{50} zur Beimpfung gewählt, da bei dieser eine Infektion aller Küken nachgewiesen wurde, während bei den weiteren gewählten Dosen Küken auftraten, die nach dem Schlupf beprobt und nicht als infiziert gewertet wurden.

Tab. 18 Schlupfraten und Infektionsraten der mit absteigenden Beimpfungsdosen beimpften 18-tägigen Hühnereier.

Beimpfungsdosis in EID_{50} (Verdünnung des Virusstocks)	10^6 EID_{50} (10^{-3})	10^5 EID_{50} (10^{-4})	10^4 EID_{50} (10^{-5})	Kontrolle
Schlupfrate	65% (13/20)	65% (13/20)	45% (9/20)	45% (9/20)
tot nach Schlupf	(2/13)	(1/13)	(0/9)	(0/9)
Infektionsrate geschlüpfte Tiere	100% (13/13)	83% (10/12)	88,9% (8/9)	
Infektionsrate ungeschlüpfte Tiere	100% (7/7)	100% (7/7)	100% (11/11)	

4.2.2 Versuch

4.2.2.1 Beimpfung mit APMV 599

Der Schlupf der mit dem APMV-1 Stamm 599 geimpften Versuchsgruppe erfolgte in einem Brüter gemeinsam mit den Sentineltieren, die mit dem gleichen Volumen isotonischer Kochsalzlösung beimpft wurden.

Aus den 120 mit APMV-1 599 beimpften Eiern der Versuchsgruppe schlüpften 98 Küken, die Schlupfrate hierbei betrug somit 81,67%. Aus den 30 parallel beimpften Eiern, aus denen die gemeinsam mit der Versuchsgruppe geschlüpften Sentineltiere rekrutiert wurden, schlüpften 18 Küken, somit ergab sich für diese Gruppe eine Schlupfrate von 60%. Die Schlupfrate der Kontrollgruppe, die räumlich von der Versuchsgruppe getrennt schlüpfte, betrug 95% (57 Küken aus 60 beimpften Eiern) (Tab. 19). Aus dieser rekrutierten sich auch die am ersten Lebenstag zugestellten Sentineltiere.

Von den sechs zur Ermittlung der Infektionsrate am ersten Lebenstag beprobten Tiere war aus fünf Tieren mittels Real-Time RT-PCR in mindestens zwei Organen virale RNA nachweisbar.

Tab. 19 Infektions-, Schlupf- und Überlebensrate der verschiedenen Versuchsgruppen.

Beimpfung	Infektionsrate	Schlupfrate	Überlebensrate (Tag 1)	Überlebensrate (Tag 10)
APMV-1 599	5/6	81,7% (98/120)	80,6%	45,9%
Kontrollgruppe (APMV-1 599)		95% (57/60)	100%	95%
Sentinels (zu APMV-1 599)		60% (18/30)	92,3%	88,5%
APMV-1 LaSota	8/9	55% (33/60)	54,2%	0%
Kontrollen (LaSota)		67,5% (27/40)	96,3%	96,3%

Im Anschluss an den Schlupf wurden die Tiere täglich einer adspektorischen klinischen Untersuchung unterzogen, die im Sinne einer Herdenuntersuchung durchgeführt wurde.

Die Tiere der Versuchsgruppe zeigten in den ersten acht Lebenstagen deutliche klinische Symptome, die sich in erster Linie durch Respirationsstörungen, insbesondere Schnabelatmung, Durchfall (kotverschmierte Kloake) und Apathie

auszeichneten. Weiterhin traten in der Versuchsgruppe direkt im Anschluss an den Schlupf viele Grätscher auf, so dass die Gruppe eine reduzierte Bewegungsaktivität und Futteraufnahme zeigte. Der Grossteil der Tiere zeigte Schläfrigkeit, die sich auch am stehenden Tier durch eine gesenkte Kopfhaltung und geschlossene Augen sowie ein gesteigertes Wärmebedürfnis manifestierte. Zusätzlich waren bei wenigen Tieren zentralnervöse Symptome feststellbar. Diese äusserten sich in Orientierungslosigkeit und ataktischem Gangbild.

Die Klinik der Tiere war deutlich ausgeprägt, so dass es in den ersten acht Lebenstagen regelmässig zum Tod von Tieren kam. Die klinischen Symptome dauerten bis zum zehnten Lebenstag an, ein Einzeltier zeigte bis zum zwölften Lebenstag Schnabelatmung. Durch den Tod aufgrund der klinischen Beeinträchtigung der Versuchsgruppe ergab sich eine Überlebensrate von 45,92% für die ersten zehn Lebenstage (40 von 98 Tieren). Im Gegensatz dazu steht eine Überlebensrate der Sentineltiere von 88,46% (23 von 26 Tieren) über die ersten zehn Lebenstage (Abb. 8). Die bis zum achten Lebenstag der Probennahme zugeführten Tiere wiesen alle massive klinische Symptome auf und wurden daher als krankheitsbedingte Abgänge gewertet. Im Anschluss an den zehnten Lebenstag waren keine weiteren Abgänge zu verzeichnen, ab diesem Zeitpunkt wurden lediglich klinisch unauffällige Tiere zur Probennahme entnommen.

4.2.2.2 Sentinelgruppe

Sowohl die Sentinel- als auch die Kontrollgruppe wurde analog zu der Versuchsgruppe am 18. Bebrütungstag mit 0,2 ml steriler isotonischer Kochsalzlösung beimpft. Die 16 gemeinsam mit den Tieren der Versuchsgruppe geschlüpften sowie 10 am ersten Lebenstag zu der mit APMV-1 599 beimpften Gruppe zugestellten uninfizierten Küken (Sentinels) zeigten sich über die gesamte Dauer des Versuchs weitgehend frei von APMV-spezifischer klinischer Symptomatik. Zwei der 18 geschlüpften Tiere der Sentinelgruppe verstarben bereits kurz nach dem Schlupf im Brüter. Am ersten Lebenstag wurden zwei Tiere, deren Beine stark grätschten, getötet. Ein weiteres Tier wurde am siebten Lebenstag aufgrund von Respirationsstörungen getötet, dieses gilt als einziges Sentineltier, das APMV-spezifischen klinischen Symptomen erlag und infolgedessen beprobt wurde.

4.2.2.3 Ungeimpfte Kontrollgruppe

Aus den 60 mit 0,2 ml isotonischer Kochsalzlösung beimpften und parallel zu der Versuchsgruppe in einem getrennten Brüter geschlüpften Eier der Kontrollgruppe schlüpften 57 Küken, die Schlupfrate der Kontrollgruppe betrug somit 95%. Zwanzig dieser Tiere wurden am ersten Lebenstag in einem getrennten Isolator aufgestellt, von denen ein Tier am achten Lebenstag starb. Die Überlebensrate für die ersten zehn Tage betrug somit 95%. Die Gruppe zeigte sich ansonsten bis zur Belastungsinfektion am 21. Lebenstag klinisch unauffällig.

4.2.2.4 Beimpfung mit APMV Clone 30

Die Brut der 60 am 18. Bebrütungstag mit 10^4 EID₅₀ APMV-1 Clone 30 in die Allantoishöhle beimpften Eier fand zeitlich versetzt zu jener der Versuchs- und Sentinelgruppe statt, deshalb wurde für diese Tiere eine eigene Kontrollgruppe mitgeführt. Aus den mit Clone 30 infizierten Eiern schlüpften 33 Tiere, woraus sich eine Schlupfrate von 55% ergibt. Die Schlupfrate der parallel mitgeführten Kontrollgruppe betrug 67,50% (27 von 40 Tieren). Aus acht der neun sofort nach dem Schlupf zur Ermittlung der Infektionsrate beprobten Tiere war virale RNA in mindestens zwei Organen nachweisbar.

Ab dem dritten Lebenstag wiesen die Tiere ein hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden auf, das sich hauptsächlich in respiratorischen Symptomen, insbesondere Schnabelatmung, Schwanzatmung und aufgeplustertem Gefieder äusserte. Ausserdem zeigten die Tiere Durchfall, ein erhöhtes Wärmebedürfnis und verminderte Bewegungsaktivität und Futteraufnahme. Innerhalb der ersten fünf Tage erlagen 20 der 24 Tiere ihren klinischen Symptomen oder wurden moribund getötet. Die vier verbliebenen Tiere wurden zehn Tage nach Schlupf aufgrund ihres anhaltend schlechten Allgemeinbefindens und starken Respirationsstörungen (Schnabelatmung) getötet. Es kam somit nicht zur Belastungsinfektion dieser Gruppe.

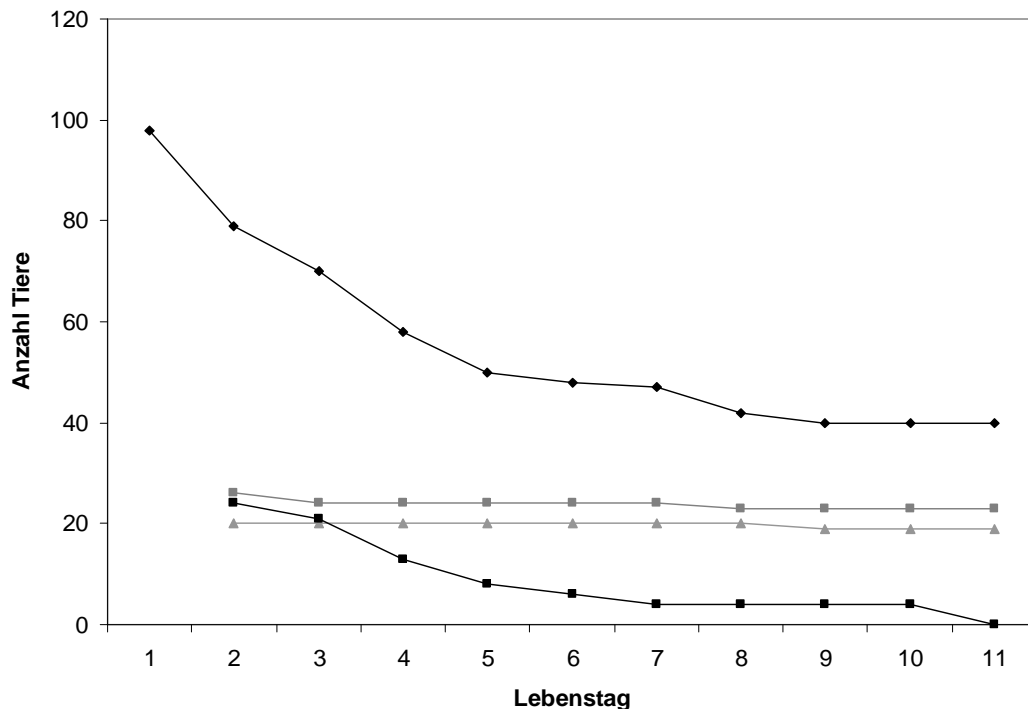


Abb. 8 Entwicklung der Tierzahlen der verschiedenen Gruppen während der ersten zehn Lebenstage.

Erfasst wurden die Tierzahlen während der ersten zehn Lebenstage als Indikator für massive klinische Beeinträchtigungen der Herde. Die Tiere der Versuchsgruppen wurden am 18. Bebrütungstag mit 10^6 EID₅₀ APMV 599 (◆) bzw. 10^4 EID₅₀ Clone 30 (■) beimpft. Die unbeimpfte Sentinelgruppe (■) setzte sich aus 16 gemeinsam mit der Versuchsgruppe geschlüpften Tieren, sowie zehn am ersten Tag zugestellten Tieren zusammen. Die Kontrollgruppe (▲) bestand aus 20 uninfizierten Tieren, die getrennt von Versuchs- und Sentinelgruppe gehalten wurden. Die Probennahme erfolgte aus klinisch moribunden Tieren, so dass es nicht zu einer zusätzlichen Reduktion der Tierzahlen durch die Probennahme kam.

4.2.2.5 Klinik nach Challenge

Sowohl die Versuchs-, als auch die Sentinel- und Kontrolltiere wurden am 21. Lebenstag einer Belastungsinfektion mit dem hochpathogenen Newcastle-Disease Virus Stamm Herts (Weybridge 33/56) in Anlehnung an die Vorgaben des Europäischen Arzneimittelbuches (European Pharmacopoeia, 2007) unterzogen.

Einen Tag nach Belastungsinfektion zeigten die Tiere aller drei Gruppen noch ungestörtes Allgemeinbefinden.

Die Tiere der Versuchsgruppe blieben bis auf eine geringgradige Reduktion der Bewegungsaktivität am zweiten und dritten Tag nach Belastungsinfektion über die gesamte Zeitdauer bis zum Versuchsende am 13. Tag nach Belastungsinfektion klinisch unbeeinträchtigt (Abb. 9).

Die Tiere der Sentinelgruppe wiesen lediglich schwache klinische Symptomatik auf, die sich in leichten Respirationsstörungen bei einzelnen Tieren sowie eines geringgradig gestörten Allgemeinbefindens am zweiten und dritten Tag nach Belastungsinfektion äusserte. Fünf Tage nach dem Challenge befand sich eines der Sentineltiere, ohne davor klinische Symptome gezeigt zu haben, in Agonie, so dass es getötet und der pathologischen Untersuchung zugeführt wurde (Abb. 11). Am siebten Tag nach der Belastungsinfektion zeigte sich ein einzelnes Sentineltier apathisch, erholte sich jedoch, so dass sich bei Versuchsende 13 Tage nach Belastungsinfektion alle verbliebenen Sentineltiere klinisch unauffällig zeigten.

Die drei der Versuchsgruppe zugestellten Tiere der Ausscheidungskontrollen wiesen über die gesamte Zeitdauer des Challenge keinerlei klinische Symptomatik auf.

Zwei Tage nach Belastungsinfektion zeigten alle Tiere der Kontrollgruppe klinische Symptome einer Newcastle Disease Infektion, die sich in Respirationsstörungen, Durchfall und Apathie äusserten (Abb. 10). Weiterhin war bei allen Tieren der Kontrollgruppe eine hochgradige Polyurie festzustellen. Zwei der Tiere waren 48 Stunden post infectionem bereits der Infektion erlegen, die restlichen acht infizierten Tiere wiesen ein erheblich gestörtes Allgemeinbefinden auf, so dass sie als klinisch moribund eingestuft und aus Tierschutzgründen getötet wurden. Keines der ungeimpften Kontrolltiere überlebte die Belastung mit velogenem Newcastle Disease Virus (Abb. 9).

Die drei der Kontrollgruppe zugestellten Tiere blieben klinisch symptomfrei. Eines der Tiere starb ohne vorher beobachtete klinische Symptome am achten Tag nach der Belastungsinfektion. Die beiden verbliebenen Tiere zeigten sich bis zum 13. Tag post challenge klinisch unauffällig.

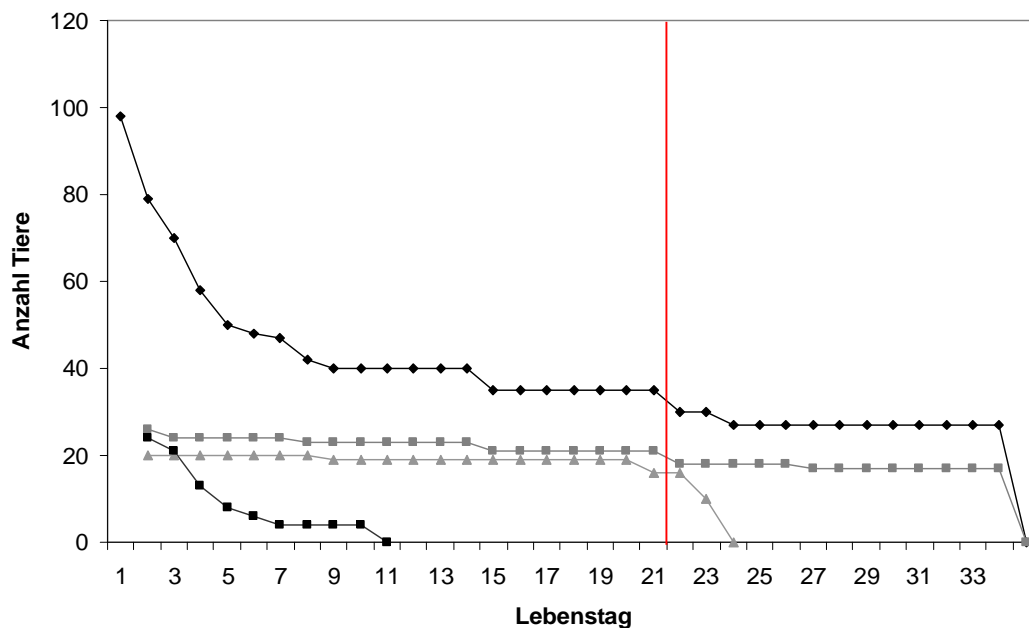


Abb. 9 Entwicklung der Tierzahlen über die gesamte Versuchsdauer.

Die rote Markierung zeigt den Zeitpunkt der Belastungsinfektion mit 10^5 EID₅₀ des velogenen Stamms Herts (Weybridge 33 / 56) am 21. Lebenstag an. Im Anschluss an die klinische Phase, die bei der mit APMV 599 (◆) beimpften Versuchsgruppe bis zum zehnten Lebenstag andauerte, sind bis zum Versuchsende keine weiteren, auf klinische Symptome zurückzuführenden Abgänge mehr zu verzeichnen. Die Reduktion der Tierzahlen der mit APMV 599 beimpften Versuchsgruppe ab diesem Zeitpunkt ist auf die Probenahme an klinisch gesunden Tieren zurückzuführen. Ein Tier der Sentinelgruppe (■) wurde fünf Tage nach Belastungsinfektion moribund getötet. Alle Tiere der ungeimpften Kontrollgruppe (▲) starben zwei Tage nach Belastungsinfektion oder wurden moribund getötet. Bei der mit Clone 30 beimpften Versuchsgruppe (■) kam es aufgrund des Todes aller Tiere vor dem 21. Lebenstag nicht zu einer Belastungsinfektion.



Abb. 10 Klinische Symptomatik der ungeimpften Kontrolltiere am zweiten Tag post Challenge (23. Lebenstag).

Die Abbildung zeigt zwei der mit massiven klinischen Symptomen getöteten Tiere der ungeimpften Kontrollgruppe zwei Tage nach Belastungsinfektion mit dem velogenen Stamm Herts (Weybridge 33 / 56). Zwei der Tiere dieser Gruppe waren zu diesem Zeitpunkt bereits gestorben, die noch lebenden Tiere wurden aus Tierschutzgründen getötet, pathologisch-anatomisch untersucht und der Probennahme zugeführt.



Abb. 11 Klinische Symptomatik des am fünften Tag post Challenge moribund aufgefundenen Sentineltieres.

4.2.3 Pathologie

4.2.3.1 Pathologie nach Schlupf

In ovo infizierte Versuchsgruppe und Sentineltiere

Alle Tiere wurden nach ihrem Tod pathologisch-anatomisch untersucht und Organproben für die Untersuchung des Virustropismus entnommen. Bei den im Anschluss an den Schlupf gestorbenen oder getöteten Tieren bis zum achten Lebenstag war eine Dottersackretention feststellbar. Weiterhin zeigte sich der Thymus aller dieser Tiere sehr prominent. Die inneren Organe dieser Tiere der Versuchs- und Sentinelgruppen zeigten sich weitgehend unauffällig, insbesondere waren keine Einblutungen in die epithelialen Schleimhäute sichtbar.

4.2.3.2 Pathologie nach Challenge

Ungeimpfte Kontrollgruppe

Die zwei verstorbenen Kontrolltiere sowie acht weitere moribund getötete Tiere der Kontrollgruppe wurden zwei Tage nach Belastungsinfektion pathologisch-anatomisch untersucht und der Probennahme zugeführt. Bei drei Tieren waren punktförmige Einblutungen in die Duodenalschleimhaut zu sehen. Der Gastrointestinaltrakt aller Tiere war futterleer, jedoch wiesen ebenfalls alle Tiere eine gestaute, stark mit Harnsäure gefüllte Kloake auf. Des Weiteren war bei allen Tieren ein vergrößerter Thymus auffällig.

In der Milz zweier Tiere waren stecknadelkopfgrosse Aufhellungen sichtbar (Abb. 12A). Das Pankreas dreier Tiere wies punktförmige, glasige Herde von ca. 1 mm Durchmesser auf (Abb. 12D). Alle weiteren Organe waren ohne besonderen Befund. Das der Kontrollgruppe zugestellte, am achten Tag nach Challenge plötzlich verstorbene Ausscheidungssentineltier wies einen dilatierten, flüssigkeitsgefüllten Kropf sowie punktförmige Einblutungen in die Pars glandularis ventriculi und das Duodenum auf. Weiterhin war bei ansonsten futterleerem Gastrointestinaltrakt der Enddarm mit gelblichen, dünnflüssigen Exkrementen gefüllt. Alle weiteren Organe dieses Tieres waren ohne besonderen Befund.

Geimpfte Versuchsgruppe und Sentineltiere

Das fünf Tage nach Belastungsinfektion moribund getötete Sentineltier zeigte sich pathologisch-anatomisch weitgehend unauffällig. Lediglich im Duodenum waren Bereiche von etwa 5 mm Durchmesser mit punktförmigen Einblutungen zu sehen.

Die dreizehn Tage nach Belastungsinfektion getöteten Tiere der Versuchsgruppe wiesen zum Todeszeitpunkt keine klinischen Symptome auf. Pathologisch-anatomisch war auch diese Gruppe weitgehend unauffällig. Drei Tiere zeigten punktförmige Einblutungen am Übergang von Drüsen- zu Muskelmagen (Abb. 12B) sowie punktförmige Einblutungen in die Duodenalschleimhaut (Abb. 12F). In einem dieser Fälle war die Einblutung mit einer im geschlossenen Zustand sichtbaren Ausstülpung des Darms verbunden (Abb. 12E).

Weiterhin waren bei einem Tier punktförmige Einblutungen in das Epicard sichtbar (Abb. 12C). Auch in dieser Gruppe waren bei sieben Tieren glasige Herde von ca. 1 mm Durchmesser im Pankreas (Abb. 12D) feststellbar. Alle übrigen Organe waren makroskopisch unverändert.

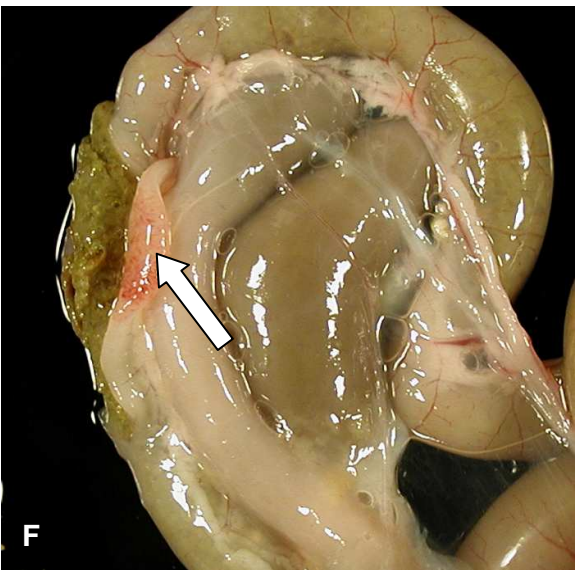
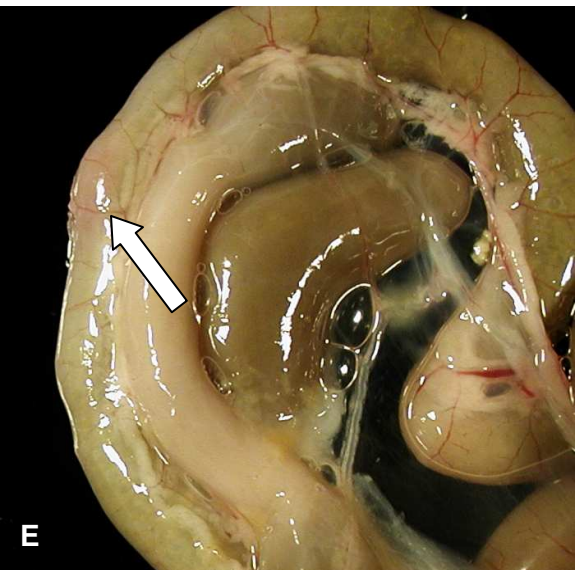
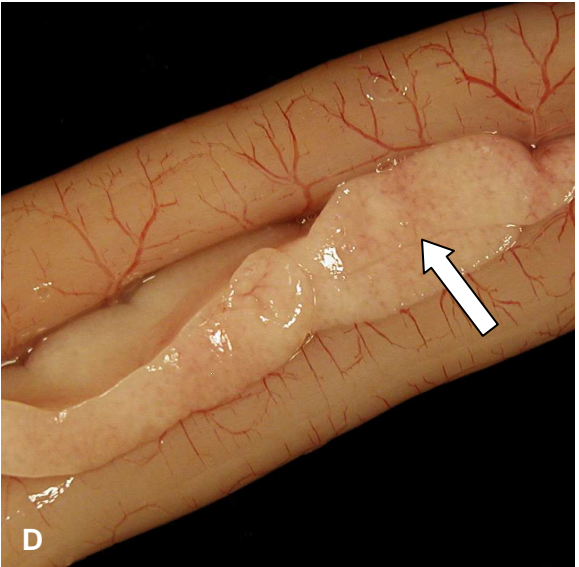
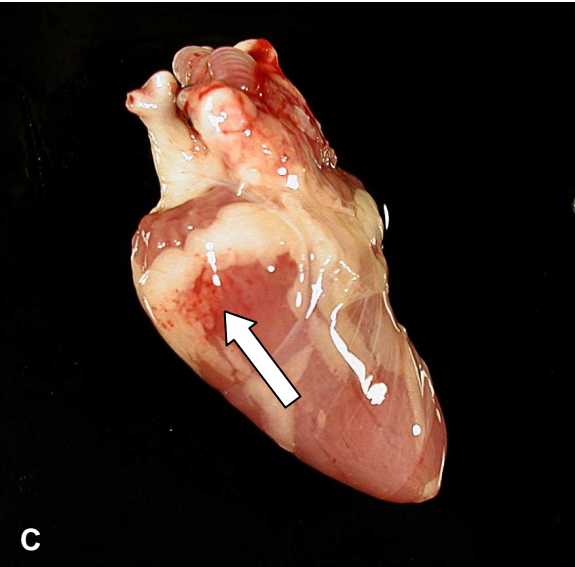
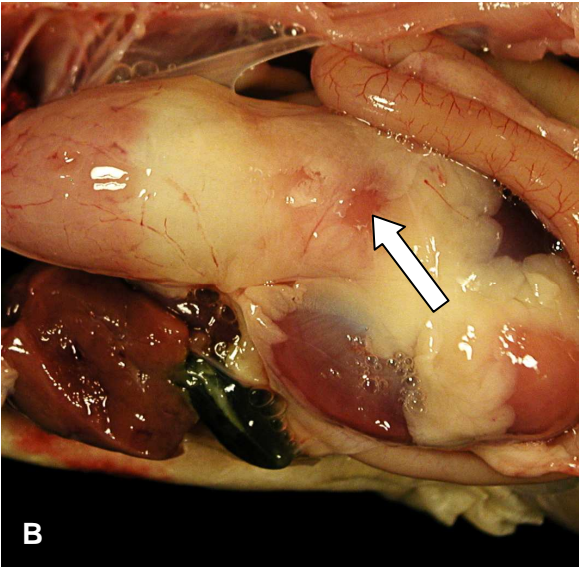
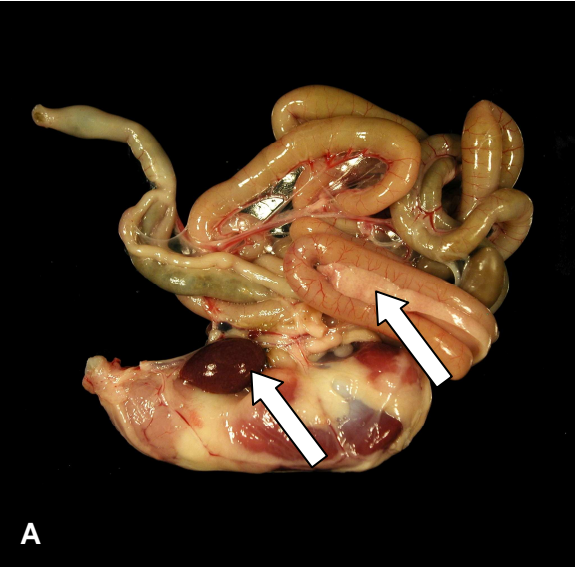


Abb. 12 Pathologisch-anatomische Befunde der 13 Tage nach Belastungsinfektion untersuchten Tiere der geimpften Versuchsgruppe.

Als pathologisch-anatomische Hauptbefunde wurden multiple punktförmige Einblutungen in unterschiedliche Organsysteme erhoben. Am ausgeprägtesten waren diese in der Mukosa des Duodenums zu beobachten (**Abb. 12F**), wobei in einem Fall die Veränderungen bereits von aussen als dunklere, rötlich verfärbte Ausstülpung sichtbar waren (**Abb. 12E**). Auch im Epikard (**Abb. 12C**) und am Übergang von Drüsen- zu Muskelmagen (**Abb. 12B**) waren punktförmige Einblutungen feststellbar. Weiterhin zeigten sich bei sieben von zehn untersuchten Tieren glasige, punktförmige Veränderungen des Pankreas (**Abb. 12D**). Bei der Betrachtung des Situs waren in einem Fall stecknadelkopfgrosse Aufhellungen der Milz (**Abb. 12A**) feststellbar.

4.2.4 Gewichtsentwicklung

Die Ermittlung der Gewichte der zur Organentnahme beprobten Tiere vor und nach der Belastungsinfektion diente als Indikator für die Herdengesundheit sowie die Beeinträchtigung der Tiere durch protrahierte Verläufe nach Belastungsinfektion (**Abb. 13**). Auch sollten verzögertes Wachstum oder starkes Auseinanderwachsen der Gruppe überprüft werden. Während vor der Belastungsinfektion die Durchschnittsgewichte der Versuchsgruppe mit 204,58 g und der Sentinelgruppe von 208,57 g im Gegensatz zu der bis zu diesem Zeitpunkt getrennt gehaltenen Kontrollgruppe (Durchschnittsgewicht: 234,85 g) etwas erniedrigt war, zeigte sich nach der Belastungsinfektion keine Differenz der Durchschnittsgewichte der verschiedenen Gruppen mehr. Auch ein starkes Auseinanderwachsen der infizierten Gruppen war nicht zu beobachten.

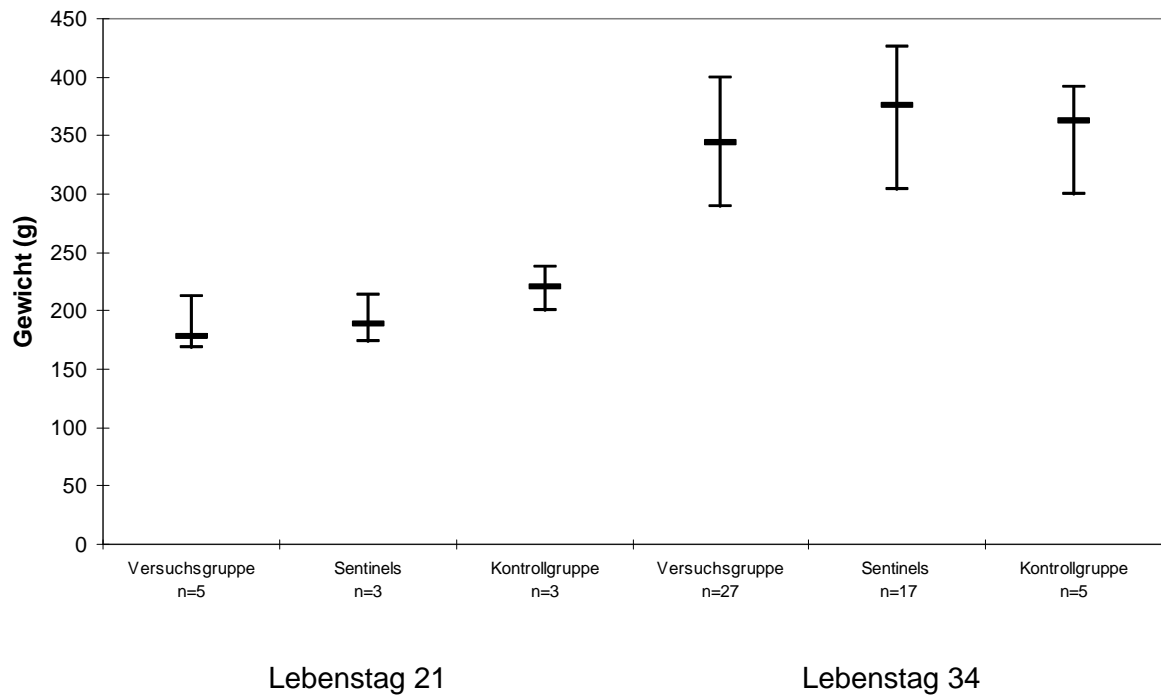


Abb. 13 Gewichte der Versuchs-, Sentinel- und Kontrollgruppen an den Lebenstagen 21 und 34.

Dargestellt ist das Mediengewicht, das maximale und das minimale Gewicht der verschiedenen Gruppen vor (Tag 21) und nach (Tag 34) der Belastungsinfektion. Während vor der Belastungsinfektion (21. Lebenstag) eine geringgradige Gewichtsreduktion der Versuchsgruppe zu verzeichnen ist, weisen die Gewichte der drei untersuchten Gruppen nach der Belastungsinfektion (34. Lebenstag) keine Unterschiede mehr auf.

4.2.5 Virusnachweis und Organtropismus

4.2.5.1 Pre Challenge

In der Versuchsgruppe wurde zum Schlupfzeitpunkt aus fünf von sechs Tieren RNA des Impfvirus nachgewiesen. Bei einem der Tiere war am ersten Lebenstag in keinem der Organe virale RNA nachweisbar, dieses Tier wurde als uninfiziert gewertet. Aus diesem Ergebnis wurde auch die Infektionsrate berechnet. An den Folgetagen wurde bis zum achten Tag nach dem Schlupf aus allen beprobten Tieren

in mindestens einem der überprüften Organe virale RNA nachgewiesen, so dass alle Tiere, die bis zum achten Tag getötet und beprobt wurden, als infiziert gelten (Tab. 20). Als Indikatoren einer systemischen Infektion wurden Leber und ZNS untersucht. Hier zeigten sich bis zum achten Lebenstag vereinzelt positive Tiere, die jedoch alle lediglich eine geringe Viruslast aufwiesen (Abb. 14 A, B).

Indikativ für den Virustropismus des Respirationssystems wurden Proben der Lunge gewählt (Abb. 14 C). Bei allen 28 bis zum achten Lebenstag beprobten und als positiv gewerteten Tieren der Versuchsgruppe war virale RNA in der Lunge nachzuweisen. Eine Ausnahme machte ein Tier, welches am ersten Lebenstag beprobt wurde und in keinem der Organe ein positives Ergebnis aufwies. In siebzehn der untersuchten Tiere war eine sehr hohe Viruslast mit einem semiquantitativen Index (im Folgenden: Index) von 3 nachzuweisen.

Bei der Untersuchung des Pankreas (Abb. 14 D) wurde ebenfalls aus einer Mehrzahl der Tiere bis zum achten Lebenstag virale RNA nachgewiesen.

Repräsentativ für den Gastrointestinaltrakt wurden Proben der Pars glandularis ventriculi, des Duodenums und des Zäkums inklusive Zäkaltonsille gewählt. Hier sind die positiven Ergebnisse der Proben aus Zäkum / Zäkaltonsille herauszustellen, die verglichen mit den anderen beprobten Organen des Gastrointestinaltraktes sowohl eine höhere Viruslast zeigten als auch eine grössere Anzahl der Tiere betrafen (Abb. 14 G).

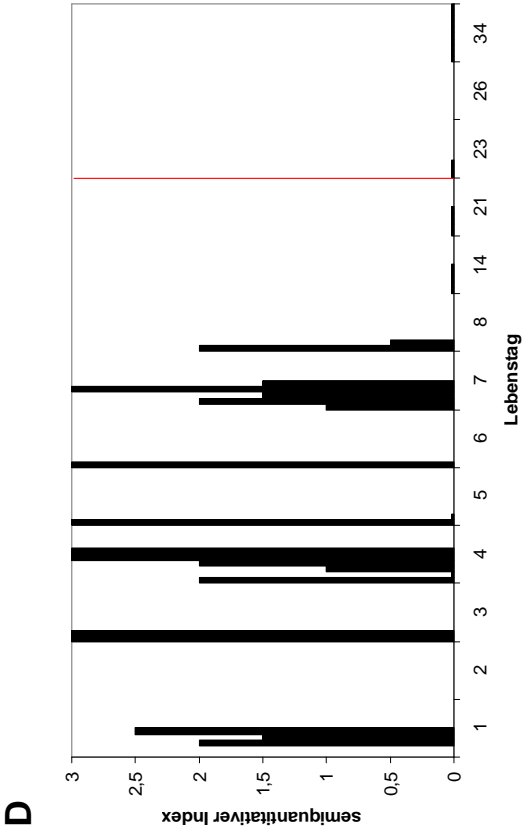
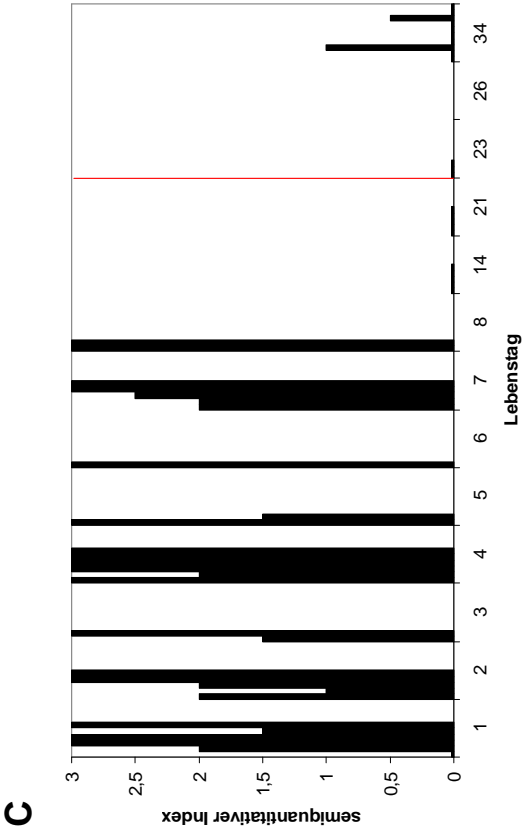
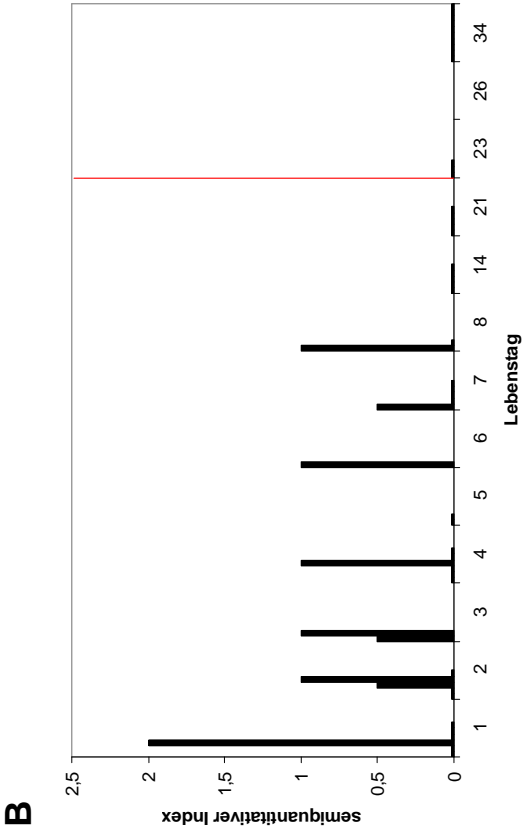
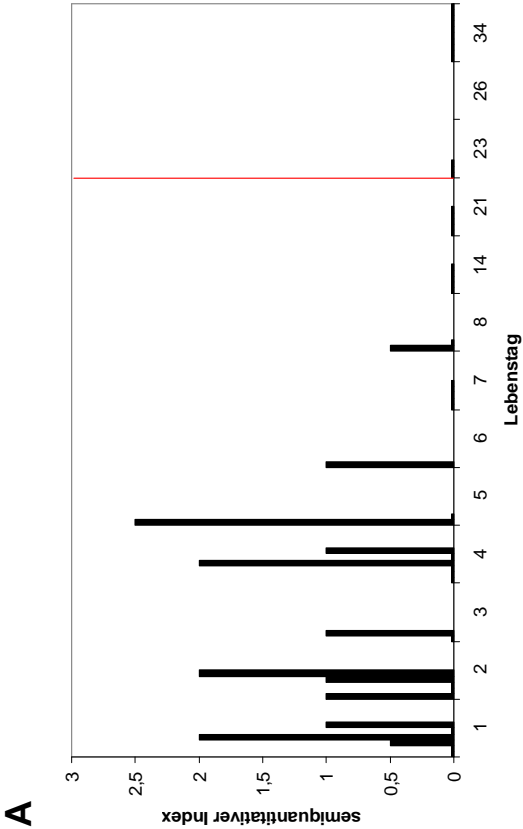
Nach dem achten Lebenstag wurde in keinem der beprobten Tiere, die vor der Belastungsinfektion aus der Gruppe entnommen wurden, virale RNA nachgewiesen.

In der Sentinelgruppe wurden lediglich am zweiten Lebenstag zwei Tiere, die stark grätschten, sowie am siebten Lebenstag ein klinisch moribundes Tier beprobt. Die Probennahme und Bewertung der Ergebnisse erfolgte analog zu den Tieren der Versuchsgruppe.

Eines der zwei am zweiten Lebenstag beprobten Tiere wies eine hohe Viruslast im Pankreas (Index 3) sowie eine geringe Viruslast in ZNS und Kot (Index 1) auf. In den anderen Organen des ersten Tieres sowie allen Organen des zweiten beprobten Tieres war keine virale RNA nachweisbar. Aus Lunge und Zäkum/Zäkaltonsille des am Tag sieben beprobten Tieres war ebenfalls virale RNA nachzuweisen. Die zwei am 14. und drei am 21. Lebenstag beprobten Tiere, die dem Vergleich mit der Versuchsgruppe dienten, wiesen wie auch die Versuchsgruppe in allen Organen negative Ergebnisse auf.

Tab. 20 Mittels RRT-PCR positiv beprobte Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten, anteilig an der Gesamtzahl beprobter Tiere.

[illegible]



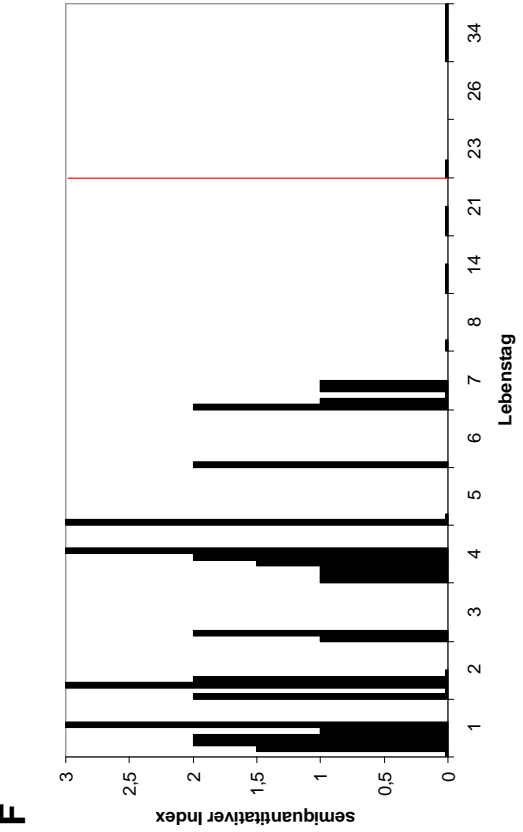
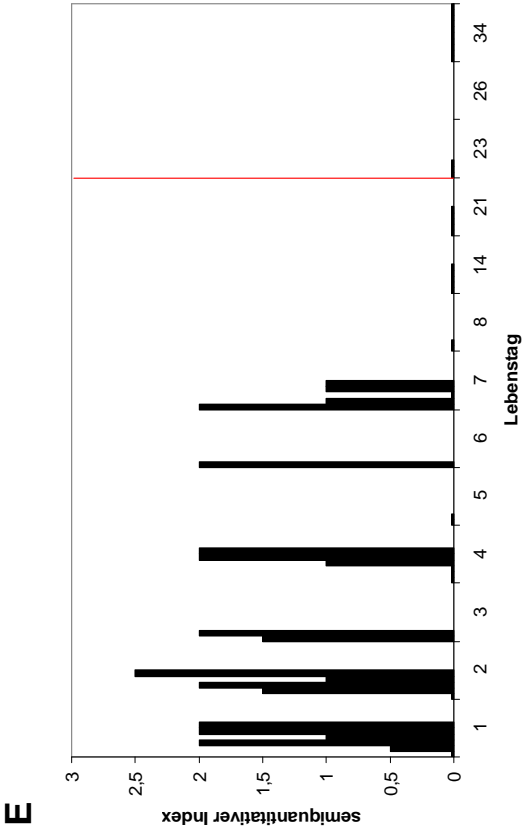
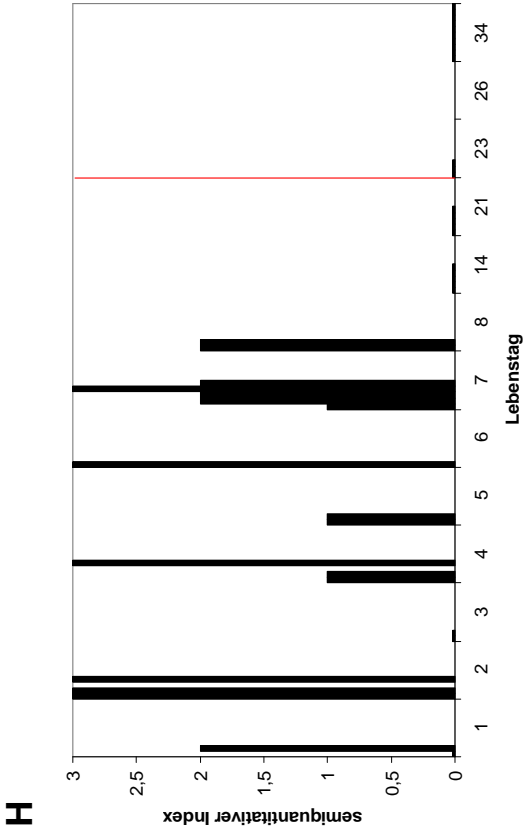
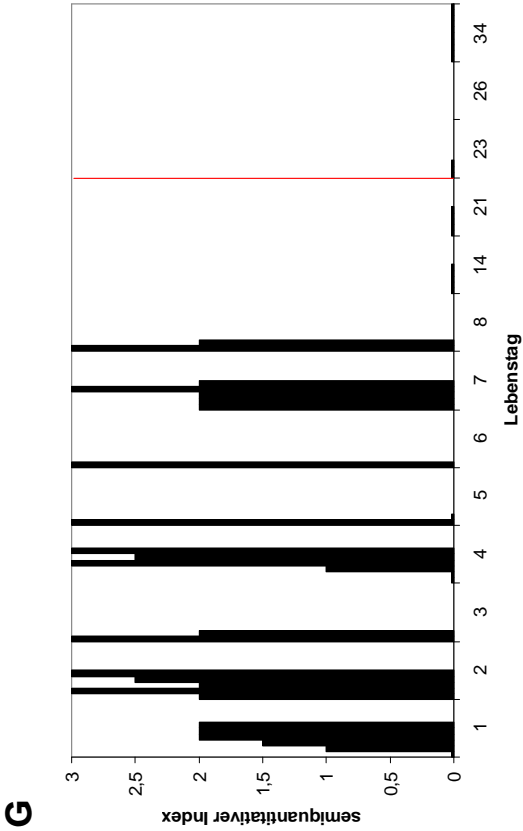


Abb. 14 Verteilung der viralen RNA in den untersuchten Organsystemen der Versuchsgruppe vor und nach der Belastungsinfektion.

Um die Ausbreitung des Virus nach in ovo Applikation im zeitlichen Verlauf zu bestimmen wurden Organproben mittels RRT-PCR untersucht. Hierfür wurden zwei Protokolle angewandt, die als Bindungsstellen Abschnitte auf dem Matrix- (M) und dem Nukleoprotein- (NP) Gen nutzen. Als Indikatoren einer systemischen Infektion wurden Leber (**A**) und ZNS (Gehirn) (**B**) gewählt. Der Tropismus im Respirationssystem wurde durch die Bestimmung viraler RNA in der Lunge (**C**) bestimmt. Das Pankreas (**D**) wurde aufgrund seiner Eigenschaft als Sekretionsorgan trypsinergere Proteasen beprobt. Die Viruslast im Gastrointestinaltrakt wurde durch Proben aus Drüsenmagen (**E**), Duodenum (**F**) und Zäkum (**G**) ermittelt, wobei die Probe des Zäkums die Zäkaltonsille einschloss. Auch die Viruslast im Kot (**H**) wurde ermittelt, um Aussagen zur Virusausscheidung der Tiere treffen zu können. Die rote Linie demarkiert den Zeitpunkt der Belastungsinfektion mit Herts (Weybridge 33/56).

Die Ergebnisse der RRT-PCR wurden wie in Kap. 3.3.6.3 beschrieben semiquantitativ gewertet.

Bei der statistischen Auswertung mittels des *Kruskal-Wallis rank sum* Tests wurde ein signifikanter Unterschied der Virusverteilung in den verschiedenen Organen festgestellt.

Bei den paarweisen Vergleichen der Organe miteinander mit Hilfe des exakten Wilcoxon Rangsummentests (Mann-Whitney-Tests) wurden 28 parallele Testungen durchgeführt. Deshalb wurde eine Sidak-Korrektur angewandt, anhand der ein kritischer p-Wert von 0,00183 ermittelt wurde. Demnach sind nur Ergebnisse mit $p < 0,00183$ signifikant. Eine signifikante Prädilektion zeigte sich nach diesen p-Werten für die Lunge im Vergleich zu Drüsenmagen, Leber und ZNS, sowie für Zäkum / Zäkaltonsille zu Leber und ZNS. Auch das Pankreas wies eine signifikant höhere Viruslast auf als das ZNS.

4.2.5.2 Post Challenge

Bei keinem der drei Tiere der Versuchsgruppe, die am 23. Lebenstag zeitgleich zum Tod der Kontrolltiere beprobt wurden, konnte virale RNA nachgewiesen werden (Abb. 15, A-H).

Am Versuchsende dreizehn Tage nach Belastungsinfektion (34. Lebenstag) hingegen wurden aus Lungenproben von zwei der zehn am 34. Lebenstag beprobten Tiere der Versuchsgruppe virale RNA in geringen Mengen (mit einem Index von 0,5 und 1) nachgewiesen (Abb. 15 C). Der Nachweis von viraler RNA aus allen weiteren Organen verlief negativ.

Ein Tier aus der Sentinelgruppe wurde aufgrund sehr schlechten Allgemeinbefindens fünf Tage nach der Belastungsinfektion (26. Lebenstag) aus der Gruppe entnommen. Bei diesem Tier war virale RNA in Zäkum/Zäkaltonsille (Index 2) sowie im Kot (Index 1) nachweisbar. Bei drei Tieren der Sentinelgruppe waren am Versuchsende dreizehn Tage nach der Belastungsinfektion noch virale RNA in Zäkum/Zäkaltonsille (Index von 0,5, 1 und 1,5), sowie bei zwei dieser Tiere in sehr geringem Masse in der Lunge (Index von jeweils 0,5) nachzuweisen. Bei einem weiteren Tier konnten mittels beider PCR Protokolle geringe Mengen (Index 1) viraler RNA aus dem ZNS nachgewiesen werden. Ansonsten verlief die Untersuchung aller weiteren Organe negativ.

Die Virusanzucht auf bebrüteten Hühnereiern verlief bei allen RRT-PCR positiven Proben der Versuchs- und Sentinelgruppe des 34. Lebenstages negativ.

Unmittelbar vor der Belastungsinfektion war bei keinem der drei untersuchten Tiere der Kontrollgruppe virale RNA nachweisbar. Zwei Tage nach der Belastungsinfektion hingegen konnte in allen Tieren der Kontrollgruppe, die zu diesem Zeitpunkt aufgrund massiver klinischer Beeinträchtigung getötet und beprobt wurden, virale RNA nachgewiesen werden. Hierbei waren Leber (Abb. 15 A), Lunge (Abb. 15 C), Pankreas (Abb. 15 B), Drüsenmagen (Abb. 15 E) und Zäkum/Zäkaltonsille (Abb. 15 G) aller Tiere als positiv zu werten. In fünf der zehn Zäka mit Zäkaltonsillen war eine sehr hohe Viruslast mit einem Index von 3 festzustellen. Bei vier weiteren Tieren war immer noch eine hohe Viruslast (Index 2) nachweisbar, lediglich ein Tier zeigte eine sehr geringe Viruslast (Index 0,5) im Zäkum. Auch in einer der Lungenproben war nur eine sehr geringe Viruslast (Index 0,5) nachzuweisen.

In acht der zehn Proben des ZNS (Abb. 15 B) sowie in neun der zehn Duodenumproben (Abb. 15 F) war virale RNA nachzuweisen.

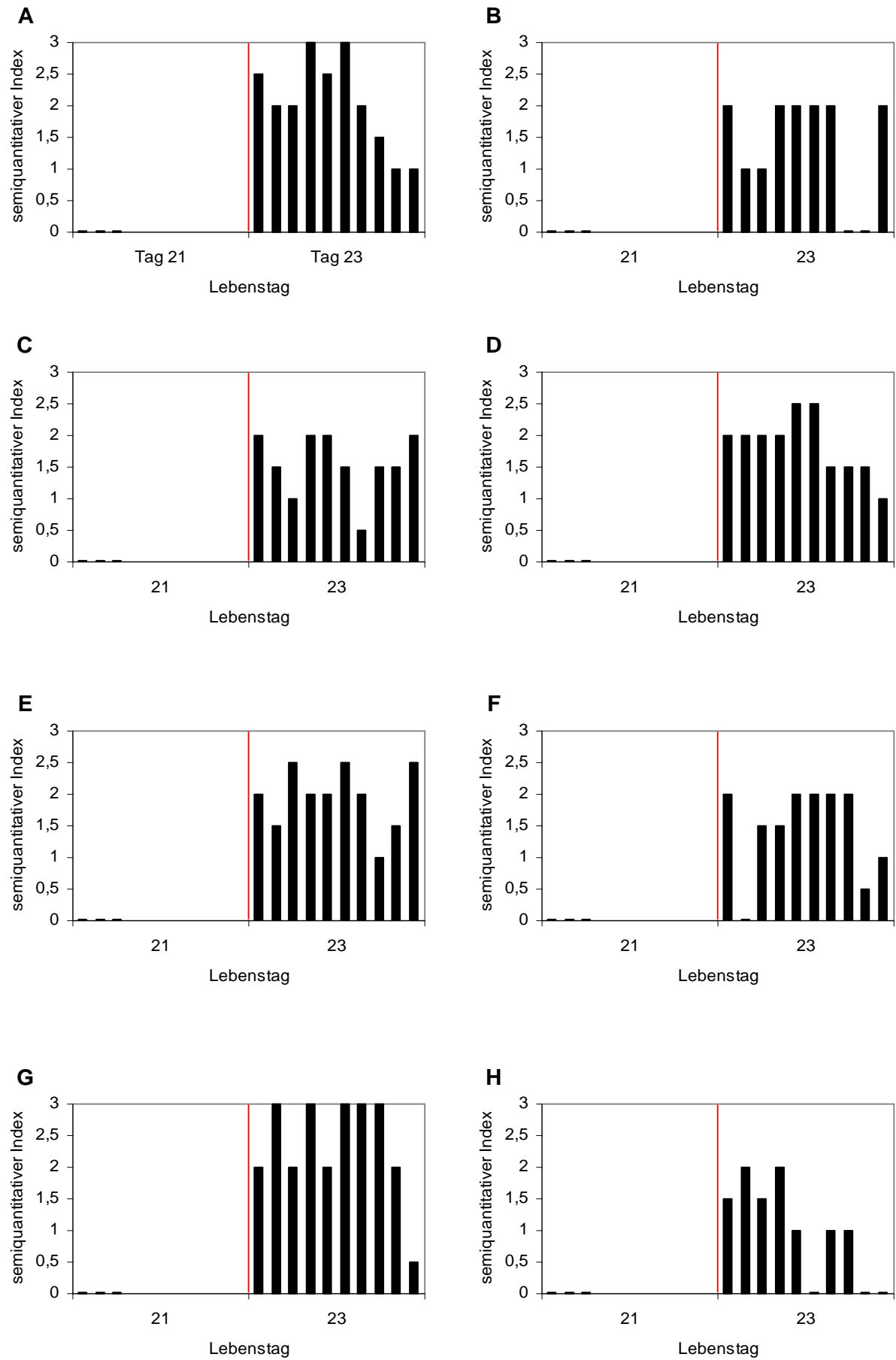


Abb. 15 Verteilung der viralen RNA in den untersuchten Organsystemen der ungeimpften Kontrollgruppe vor (Lebenstag 21) und nach (Lebenstag 23) der Belastungsinfektion.

Untersucht wurden Leber (**A**), ZNS (**B**), Lunge (**C**), Pankreas (**D**), Drüsenmagen (**E**), Duodenum (**F**) und Zäkum mit Zäkaltonsille (**G**) mittels der beiden in Kap. 3.3 beschriebenen RRT-PCR Protokolle. Auch die kloakale Ausscheidung wurde anhand der Untersuchung von Kot (**H**) erfasst. Parallel zu den moribund getöteten Tieren der Kontrollgruppe wurden drei Tiere der Versuchsgruppe ohne klinische Symptome beprobt, bei denen in keinem der untersuchten Organe virale RNA nachzuweisen war. Die rote Linie demarkiert den Zeitpunkt der Belastungsinfektion mit dem velogenen Stamm Herts (Weybridge 33 / 56).

4.2.6 Ausscheidung und Übertragung

4.2.6.1 Ausscheidung vor Belastungsinfektion

Die Entnahme der Kotproben erfolgte zusammen mit der Organprobennahme zur Bestimmung des Virustropismus (Abb 13 H). Aufgrund zu geringen Mengen an Kot im Enddarm konnten während der ersten acht Lebenstage nicht alle Tiere auf Ausscheidung hin untersucht werden.

Wie in Tab. 21 gezeigt konnte bei einer Mehrheit der Tiere, die zwischen dem ersten und dem achten Lebenstag beprobt wurden, per RRT-PCR wie in Kap. 3.3 (Material und Methoden, PCR) beschrieben, eine Virusausscheidung im Kot nachgewiesen werden. Eine Ausnahme hiervon machte ein Tier, welches direkt nach dem Schlupf beprobt wurde, bei dem weder in den Organen noch im Kot virale RNA nachweisbar war. Auch am dritten Lebenstag konnte kein Virus im Kot nachgewiesen werden, trotzdem in Organen derselben Tiere virale RNA amplifiziert werden konnte. Eine Ausscheidung bei negativem Organbefund lag in keinem Fall vor. So wurde auch am 14. und 21. Lebenstag keine Ausscheidung von Impfvirus mehr festgestellt.

Tab. 21 RRT-PCR Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Virusausscheidung des Impfvirus vor und nach Belastungsinfektion.

	Lebenstag	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	14 ^a	21 ^a	23 ^b	25 ^b	34 ^a
Versuchsgruppe	positiv	1	3	0	3	2	1	5	2	0	0	0	0	0
	negativ	1	0	2	0	0	0	0	0	5	5	10	10	10
	Durchschnitt cT	25,4	21,52		27,18	31,74	24,81	26,66	26,83					
Sentinels	positiv		1				0					0	3	0
	negativ		1				1					10	10	10
	Durchschnitt cT		33,3										30,83	
Kontrollgruppe	positiv											10		
	negativ											10		
	Durchschnitt cT											31,32		

^a Kotproben, ^b Tupferproben (Kloake)

Die Infektiosität des ausgeschiedenen Impfvirus und dessen Übertragung durch die Versuchstiere wurde durch das Zustellen von Sentineltieren überprüft.

Vor der Belastungsinfektion wurden die Organe von drei Tieren beprobt, von denen zwei am zweiten Lebenstag aufgrund Grätschens und eines am siebten Lebenstag aufgrund schwerer Respirationsstörungen tierschutzgerecht getötet wurden. In den Organen von zwei dieser drei Tiere war mittels RRT-PCR virale RNA nachzuweisen, während eines der am zweiten Lebenstag beprobten Tiere virologisch negativ war.

Als weiterer Untersuchungsparameter wurde die Induktion einer protektiven Immunität durch Evaluierung des klinischen Schutzes nach Belastungsinfektion mit dem velogenen Newcastle Disease Virusstamm Herts (Weybridge 33 / 56) ermittelt. Fünf Tage im Anschluss an die Belastungsinfektion, die analog zu den Versuchstieren erfolgte und in die 18 Sentineltiere miteinbezogen wurden, wurde eines der Tiere in Agonie getötet. Alle weiteren Tiere waren klinisch vor einer Infektion mit velogenem Newcastle Disease Virus geschützt, obwohl wie in Kap. 4.2.5 angeführt auch am Versuchsende dreizehn Tage nach Challenge bei einigen Tieren noch virale RNA in den Organen nachgewiesen wurde.

Auch die Ermittlung des Serostatus der Sentineltiere wurde vor und nach der Belastungsinfektion vorgenommen, wobei mittels ELISA bei einem der unmittelbar vor Belastungsinfektion (21. Lebenstag) beprobten Tieren, mittels Hämagglutinationshemmungstest bei allen beprobten Tiere ab dem 14. Lebenstag eine Serokonversion festzustellen war. Die serologischen Einzelergebnisse sind Kap. 4.2.7 zu entnehmen.

Die Infektiosität des durch die geimpften Versuchstiere ausgeschiedenen Virus ist demnach ausreichend, eine Ausbreitung in die Organe und eine Immunantwort bei den untersuchten Sentineltieren auszulösen.

4.2.6.2 Ausscheidung nach Belastungsinfektion

Die Untersuchung der Ausscheidung von Challengevirus erfolgte zwei und vier Tage nach Belastungsinfektion. Beprobte wurden jeweils dieselben zehn Tiere jeder Gruppe. Für die Kontrollgruppe stehen aufgrund des Todes aller Tiere zwei Tage nach Belastungsinfektion nur für diesem Zeitpunkt Daten zur Verfügung.

In den Kloakentupfern der Tiere der Versuchsgruppe war zu keinem Zeitpunkt nach der Belastungsinfektion virale RNA nachweisbar. Auch in den am Versuchsende (34. Lebenstag) von zehn Tieren entnommenen Kotproben wurde kein Virus ausgeschieden.

In den Kloakentupfern der den geimpften Tieren zugestellten Sentinels war zwei Tage nach Belastungsinfektion keine virale RNA nachweisbar, vier Tage nach Belastungsinfektion konnte jedoch in drei der zehn Proben virale RNA nachgewiesen werden. Der durchschnittliche cT Wert dieser Proben betrug 30,825 (Tab. 22). In den Kotproben der zehn am 34. Lebenstag zu Versuchsende beprobten Sentineltiere konnte keine Virusausscheidung mehr festgestellt werden.

In den Kloakentupfern der Tiere der Kontrollgruppe wurde zwei Tage nach Belastungsinfektion in allen Proben virale RNA nachgewiesen. Der durchschnittliche cT Wert dieser Proben betrug 31,32 (Tab. 21).

Den Versuchs- und Kontrollgruppen wurden zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion jeweils drei unbelastete Sentineltiere zugestellt, mit deren Hilfe die Infektiosität des ausgeschiedenen Virus überprüft werden sollte.

Die den Versuchstieren zugestellte Gruppe wies zu keinem Zeitpunkt nach dem Challenge klinische Besonderheiten auf. In den Organen der Tiere, die gemeinsam mit der Versuchsgruppe am 13. Tag post challenge getötet wurden, war kein Virus nachweisbar. Auch eine in HAH oder ELISA messbare Serokonversion erfolgte bei diesen Tieren nicht.

Die der ungeimpften Kontrollgruppe zugestellten Tiere wirkten adspektorisch drei Tage post challenge etwas ruhiger, zeigten aber keine spezifischen Krankheitssymptome. Sieben Tage post challenge wies eines der Tiere ein deutlich

gestörtes Allgemeinbefinden auf, das sich durch Apathie, aufgeplustertes Gefieder und vermehrtes Ruhe- und Wärmebedürfnis äusserte. Die anderen beiden Tiere schienen ruhiger, wiesen aber keine spezifischen Krankheitssymptome auf. Acht Tage post challenge starb das klinisch am stärksten erkrankte Tier. In allen Organen, nicht jedoch im Kot des verstorbenen Tieres, war mittels Real-Time RT-PCR virale RNA nachweisbar, wobei sich keine deutlichen organspezifischen Unterschiede in der Viruslast abzeichneten.

Die beiden anderen der Kontrollgruppe zugestellten Tiere blieben bis zum Versuchsende am 34. Lebenstag klinisch unauffällig, bei der Beprobung am Versuchsende war in keinem der Organe virale RNA nachzuweisen. Auch die Bildung spezifischer Antikörper erfolgte bei diesen Tieren nicht.

Es ist demnach von einer Ausscheidung und Übertragung des Virus durch die infizierten Tiere der ungeimpften Kontrollgruppe auszugehen, nicht jedoch durch die Tiere der Versuchsgruppe. Durch die Kontrolltiere wurde jedoch nicht ausreichend velogenes Virus ausgeschieden, um alle zugestellten Tiere unter den gegebenen Haltungsbedingungen zu infizieren.

4.2.7 Serologie und Immunologie

4.2.7.1 Hämagglutinationshemmungstest

Mittels Hämagglutinationshemmungstest wurden oberflächenepitopspezifische Antikörper nachgewiesen. Als Vollvirusantigen wurde hierbei APMV-1 Clone 30 (LaSota) verwendet. Mit dieser Methode konnten im Serum der Tiere der Versuchsgruppe der Tage 4, 5 und 6 keine spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Tab.22). An Tag 7 waren erstmals schwache Seroreaktivitäten zu sehen. An Tag 14 und an allen darauffolgenden Probennahmedaten schliesslich wiesen die Seren aller untersuchten Tiere spezifische hämagglutinationshemmende Eigenschaften auf. Hierbei war ein durchschnittlicher Anstieg der Seroreaktivität der Tiere von einer \log_2 Stufe nach dem Challenge sichtbar (Abb. 16).

Auch in der Gruppe der Sentineltiere war das Ergebnis aller Proben ab dem 14. Lebenstag als positiv zu werten (Tab. 23). Die Reaktivitäten der gewonnenen Proben bis zum Zeitpunkt des Challenge blieben jedoch in ihrer Höhe etwas hinter denen der Versuchsgruppe zurück (Abb. 16). Im Anschluss an den Challenge war bei den

Sentineltieren ein Titeranstieg zu vermerken, so dass einzelne Tiere 13 Tage post challenge HAH-Titer von 1:2048 ($11 \log_2$) aufwiesen, während vor dem Challenge Maximaltiter von 1:16 ($4 \log_2$) zu verzeichnen waren.

Die Proben der Tiere der Kontrollgruppe waren sowohl vor als auch nach dem Challenge bis zum Tod der Tiere als negativ zu werten.

Tab. 22 Serologische Ergebnisse der Versuchs-, Sentinel- und Kontrollgruppen über den gesamten Versuchszeitraum.

Lebenstag	Versuchsgruppe			Sentinels			Kontrollen		
	HAH positiv	ELISA positiv	ELISA fraglich	HAH positiv	ELISA positiv	ELISA fraglich	HAH positiv	ELISA positiv	ELISA fraglich
4	0/5	0/5	0/5						
5	0/2	0/2	0/2						
6	0/1	0/1	0/1						
7	1/4	0/4	0/4	0/1	0/1	0/1			
8	1/2	0/2	0/2						
14	5/5	0/5	0/5	2/2	0/2	0/2			
19							0/5	0/5	0/5
21	5/5	0/5	2/5	3/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
23	3/3	1/3	1/3				0/8	0/8	0/8
26				0/1	0/1	0/1			
29							0/1	0/1	0/1
34	27/27	15/27	5/27	9/9	8/9	1/9			

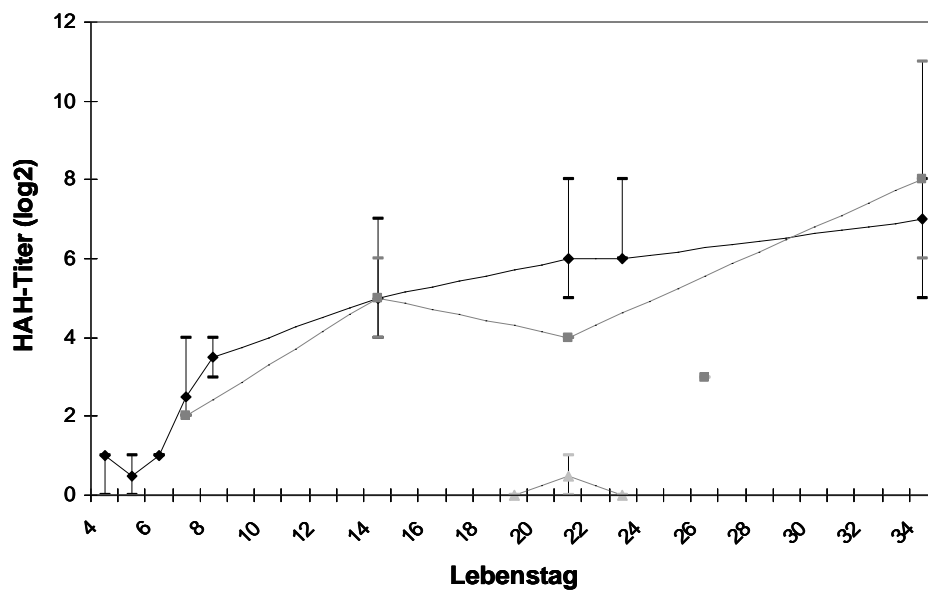


Abb. 16 Verlauf der Serumantwort im Hämagglutinationshemmungstest.

Dargestellt sind die Medianwerte der in ovo infizierten Versuchsgruppe (♦), der Sentinelgruppe (■) und der Kontrollgruppe (▲) sowie die Maximal- und Minimaltiter in \log_2 Stufen. Die rote Linie demarkiert den Zeitpunkt der Belastungsinfektion. Der Einzelwert an Tag 26 zeigt den HAH-Titer eines Sentineltiers, welches fünf Tage nach Belastungsinfektion ohne eine nachweisbare Bildung von Antikörpern verstarb. Aufgrund der Tatsache, dass Endblut untersucht wurde, fand keine zweifache Untersuchung desselben Tieres statt.

4.2.7.2 ELISA

Die gewonnenen Seren wurden in einem kommerziellen ELISA (recNDV ELISA der Firma Labordiagnostik Leipzig) gemäss Herstellerangaben getestet.

Nach Auswertung der Messergebnisse mittels der im Test implementierten Methode konnten, wie in Tab. 23 zusammengefasst, in der Versuchsgruppe an den Tagen 4, 5, 6, 7, 8 und 14 ausschliesslich seronegative Tiere ermittelt werden. Drei Wochen nach Schlupf der Tiere wurde erstmals eines der fünf untersuchten Tiere als fraglich eingestuft (Abb. 17 A). Zwei Tage im Anschluss an den Challenge (23. Lebenstag) war eines von drei Tieren als seropositiv zu werten, ein weiteres wurde als fraglich eingestuft. 13 Tage nach dem Challenge waren 15 von 27 Tieren der Versuchsgruppe serokonvertiert und galten als seropositiv. Fünf weitere waren als

fraglich einzustufen. Sieben der 27 Tiere waren weiterhin seronegativ (Tab. 23, Abb. 17).

Auch in der Gruppe der Sentineltiere war erst am 21. Lebenstag eine Serokonversion eines von drei Tieren festzustellen. Ein fünf Tage im Anschluss an den Challenge gestorbenes Tier war nicht serokonvertiert, wogegen dreizehn Tage im Anschluss an die Belastungsinfektion acht der neun untersuchten Sentineltiere als positiv und das verbleibende Tier als fraglich eingestuft wurden.

Die Tiere der Kontrollgruppe blieben bis zu ihrem Tod zwei Tage nach Belastungsinfektion seronegativ.

Der Korrelationskoeffizient der Ergebnisse der serologischen Untersuchungen mittels ELISA und Hämagglutinationshemmungstest mittels des Pearsonschen Masskorrelationskoeffizienten betrug 0,77.

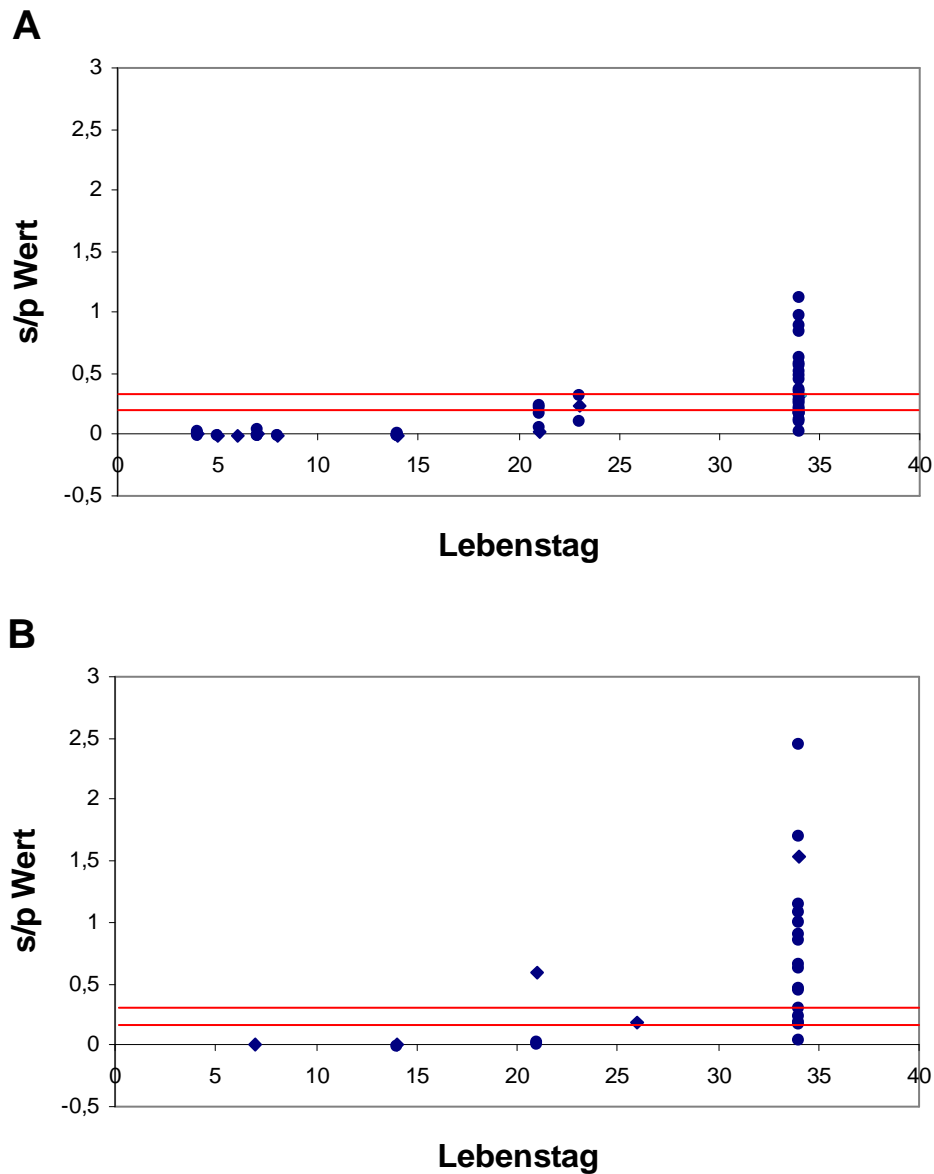
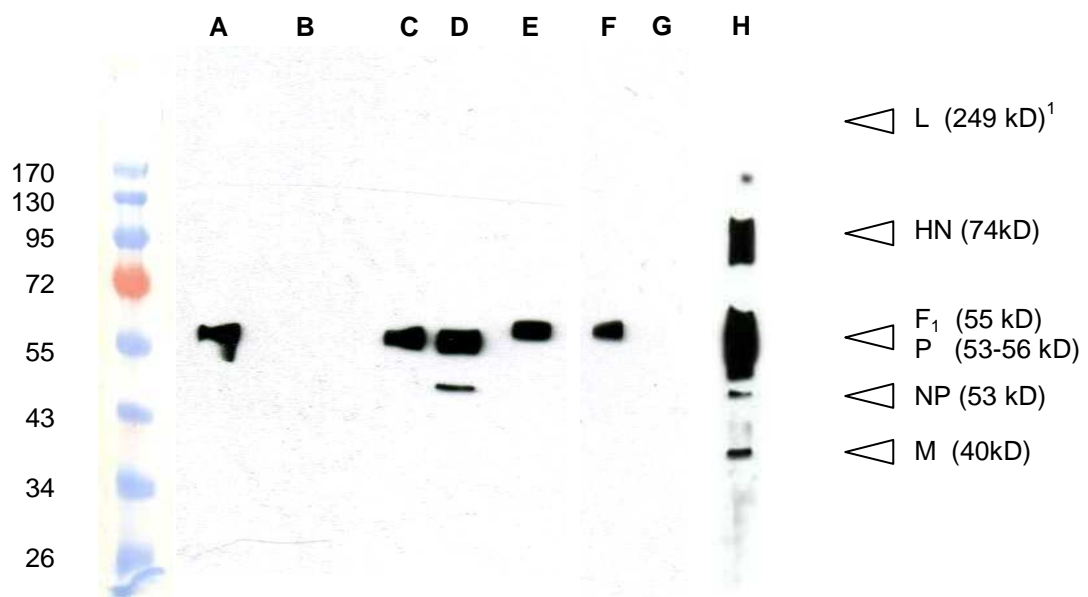


Abb. 17 Verlaufs der Serumantwort im kommerziellen ELISA.

Aufgetragen sind die s/p Werte der Tiere der Versuchs- (A) und Sentinelgruppe (B), die aus den gemessenen optischen Dichten nach Herstellerangaben errechnet wurden, gegen den Lebenstag. Die roten Linien markieren die Schwellenwerte für fragliche (s/p Wert von 0,2) und positive (s/p Wert von 0,3) Ergebnisse. Keines der Versuchstiere war vor der Belastungsinfektion als positiv zu werten, während eines der drei am 21. Lebenstag beprobten Sentineltiere ein positives Ergebnis aufwies.

4.2.7.3 Western Blot

Die Serumproben der Versuchsgruppe und der Sentineltiere, die bei der Untersuchung mittels ELISA keine und mittels Hämagglutinationshemmungstest lediglich eine schwache Reaktivität aufwiesen, wurden weiterhin einer Untersuchung mittels Western Blot zugeführt. Hierbei handelt es sich um die Serumproben des 14. Lebenstages der Tiere. Als Antigen wurde gereinigtes Vollvirus (NDV Clone 30) auf die Western Blot Membran aufgebracht. Vier der fünf untersuchten Proben der Versuchsgruppe der Proben vom 14. Lebenstag wiesen im Bereich der F Proteinbande eine Reaktivität auf, zusätzlich wies eines der Seren eine Reaktivität im Bereich der Doppelbande des NP und P Proteins auf (Abb. 18). Es ist keine Reaktivität gegen die übrigen Proteine festzustellen. Von den beiden untersuchten Seren der Sentineltiere wies eines der beiden Seren eine Reaktivität im Bereich der F Proteinbande auf.



¹ Proteingrößen nach GRUND, 2004

Abb. 18 Western Blot Ergebnisse der an Tag 14 beprobten Tiere.

Vier von fünf der beprobten Versuchstiere (A bis E) und eines der beiden beprobten Sentineltiere (F, G) wiesen spezifische Seroreaktivität im Bereich der F Proteinbande (67kD) auf. Eines der Versuchstiere wies zusätzlich dazu eine spezifische Reaktivität im Bereich der NP / P Proteinbande (53kD) auf. Die fehlende Hintergrundreaktivität spricht für eine sehr

spezifische Reaktion. Als Positivkontrolle wurde das Serum eines am 23. Lebenstag beprobten Tieres der Versuchsgruppe mitgeführt (**H**), welches spezifische Banden gegen die Proteine M, NP, P, F und HN aufweist.

4.2.7.4 Zelluläre Immunantwort

Die Auswertung der CD4, CD8, Bu1A und MHCII markierten Zellen wurden in Prozent der Gesamtlymphozytenpopulation angegeben.

Bei den Tieren der Kontrollgruppe ist am zweiten Tag nach Belastungsinfektion ein prozentualer Abfall der CD8 markierten cytotoxischen Zellen, Bu1A markierten B Lymphozyten und MHCII markierten antigenpräsentierenden Zellen sichtbar. Im Gegensatz dazu ist ein prozentualer Anstieg der CD4 markierten T-Helferzellen zu verzeichnen.

Im Gegensatz zu den Tieren der Kontrollgruppe zeigen die Tiere der Versuchs- und der Sentinelgruppe einen schnellen Anstieg der CD4 markierten T-Helferzellen zwei Tage nach Belastungsinfektion sowie einen etwas verzögerten prozentualen Anstieg der CD8 markierten cytotoxischen Zellen. Ein prozentualer Abfall der Populationen der B-Zellen sowie der anderen antigenpräsentierenden Zellen (MHCII) ist auch bei Versuchs- und Sentineltieren zu beobachten, jedoch nicht im selben Masse wie bei den Kontrolltieren. Vier Tage nach Belastungsinfektion ist bei Versuchs- und Sentinelgruppe ein erneuter Anstieg der B-Lymphozyten und anderen antigenpräsentierenden Zellen zu verzeichnen, der bis zum Versuchsende 13 Tage nach Challenge anhält (Abb. 19).

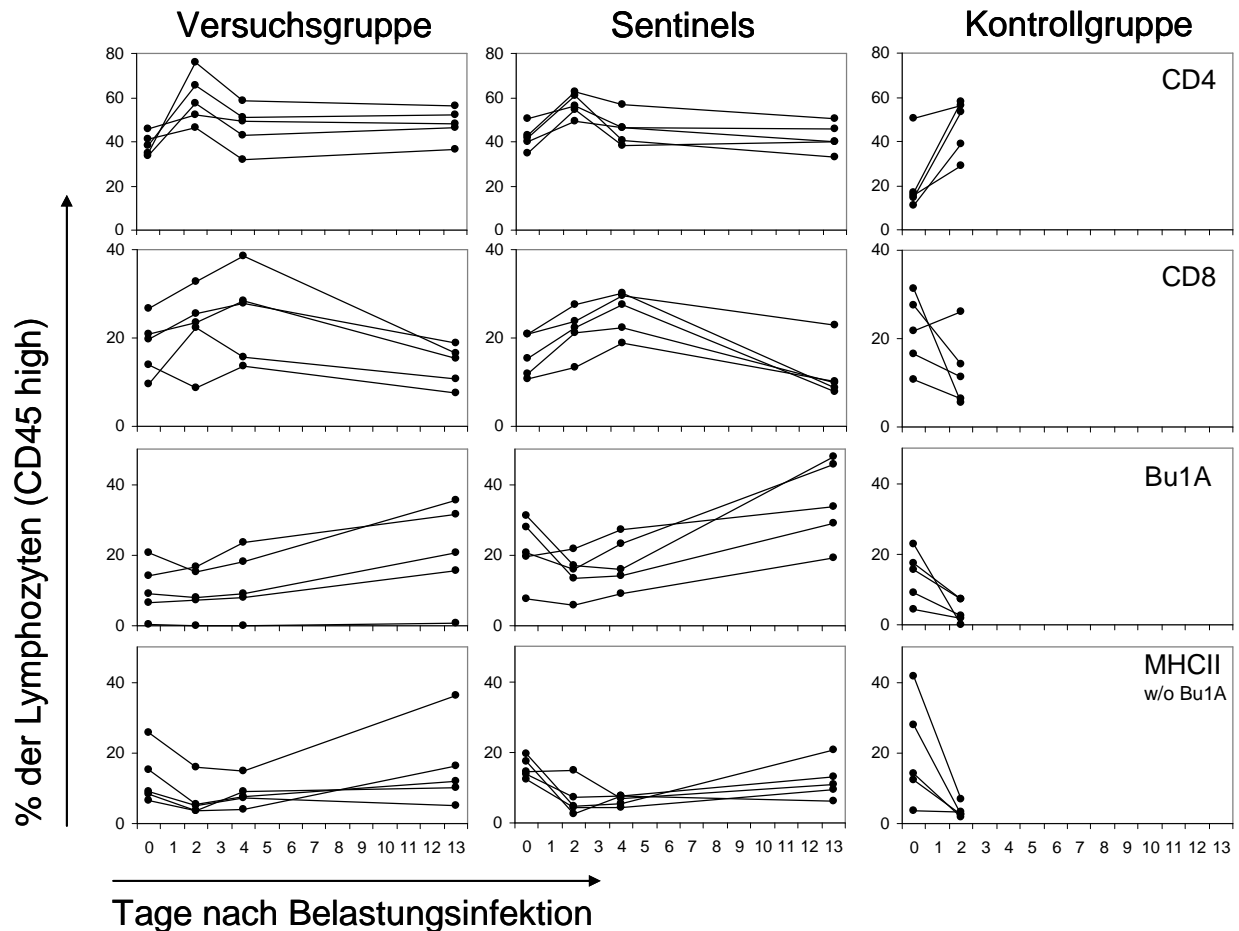


Abb. 19 Entwicklung der zellulären Immunantwort nach der Belastungsinfektion.

Dargestellt sind die prozentualen Anteile der T-Helferzellen (CD4), cytotoxischen Zellen (CD8), B-Lymphozyten (Bu1A) und anderen antigenpräsentierenden Zellen ausser den B-Lymphozyten (MHCII) an der Gesamtlmphozytenpopulation. Während bei der Kontrollgruppe am zweiten Tag nach Challenge ein deutlicher Abfall der CD8-markierten cytotoxischen Zellen sowie eine Abnahme der B-Lymphozyten auf nahezu null vorliegt, ist bei den Versuchs- und Sentineltieren ein rascher prozentualer Anstieg der T-Helferzellen und cytotoxischen Zellen zu verzeichnen, der am vierten Tag post Challenge von einer Antwort der B-Lymphozyten abgelöst wird.

5. Diskussion

5.1 Etablierung einer Real-Time RT-PCR

Im Rahmen der Arbeit wurde ein neues Real Time RT-PCR Protokoll hinsichtlich seiner Anwendbarkeit für den Nachweis viraler RNA der Stämme APMV-1 599 und Herts 33 / 56 evaluiert und optimiert. Dieser Test diene der Absicherung der Ergebnisse eines Tierversuchs zu Organtropismus und Viruspersistenz nach in ovo Infektion mit dem lentogen APMV-1 Isolat 599 sowie nach Belastungsinfektion mit dem velogenen Isolat Herts (Weybridge 33 / 56). Parallel angewandt wurden das publizierte und validierte Protokoll nach WISE et al. (2004), welches zum Einen die Evaluierung des entwickelten RRT-PCR Protokolls ermöglichte, zum Anderen eine zusätzliche Überprüfung und Bestätigung der Ergebnisse lieferte.

Das entwickelte RRT-PCR Protokoll nutzt zur Amplifikation einen konservierten Bereich des für das Nukleoprotein kodierenden RNA Genoms. Infolge des Gradienten bei der Amplifikation von mRNA liegt das für das NP Protein kodierende mRNA Transkript in der höchsten Kopienzahl vor (TOYODA et al, 1987).

Bei einem initialen Vergleich sieben verschiedener Primerkombinationen erfassten die auf Bereiche des für das aminoternale Ende des NP-Proteins kodierenden Gens gelegten Primer vier repräsentativ gewählte heterogene Stämme besser als das Primerpaar 54F / 166R, welches auf den für das carboxyterminale Ende des NP-Proteins kodierenden Bereich gelegt wurde. Allerdings war nur mit einem der ausgewählten Primerpaare die Amplifikation einer Auswahl aller vier repräsentativ ausgewählten sehr heterogenen Stämmen möglich. Das final ausgewählten Primerpaar, das ein Fragment von 165 Basenpaaren zwischen den Positionen 1066 und 1231 auf dem Gesamtgenom amplifiziert, liegt aufgrund der negativen Polarität des Paramyxovirusgenoms auf Genomebene am 5'-Ende der für das NP-Protein codierenden Sequenz. Demnach liegt die in der RRT-PCR amplifizierte Sequenz also auf der für das aminoternale Ende kodierenden Region. Diese gilt sowohl bei Newcastle Disease Virus als auch bei Sendaivirus auf Proteinebene als stark konserviert im Gegensatz zum hochvariablen carboxyterminalen Ende (BUCHHOLZ et al, 1994; PHAM, 2004). Dies zeigte sich auch bei der von den gewählten Primern amplifizierten Sequenz, die eine Auswahl von vier repräsentativen sehr heterogenen Stämmen zu erkennen vermochten.

Der Konservierungsgrad der amplifizierten Sequenz war dennoch nicht ausreichend, um mit einer konventionellen 5' Nuklease Oligosonde (TaqMan Sonde) eine vergleichbare Leistungsfähigkeit zur etablierten Methode nach WISE et al (2004) bei der Detektion von sowohl APMV-1 599 (Genotyp 2) als auch Herts 33 / 56 (Genotyp 4) zu gewährleisten. Die unregelmässigen Real-Time Kurvenverläufe bei niedriger Gesamtfluoreszenz sind hinweisend auf ein frühzeitiges Abschmelzen der Sonde vom Komplementärstrang ohne Degradation der Sonde durch die 5' Endonuklease Wirkung der Taq Polymerase und somit ohne Freiwerden der Fluoreszenz. Daher wurde eine Sonde eingesetzt, bei der sechs der konventionellen Nukleotide durch LNA Basen ersetzt wurden (PETERSEN & WENGEL, 2003). Dies bewirkte eine Stabilisierung des DNA-LNA Oligonukleotiddimers, durch die eine Sondenverkürzung von 23 auf 17 Basen erwirkt werden konnte. Durch die erzwungene sterische Konformation wird die Affinität der Oligonukleotidsonde zu dem komplementären DNA Strang und somit die Schmelztemperatur (T_m) erhöht. Ein Abschmelzen der Sonde vor dem Nukleaseverdau und somit vor der Fluoreszenzemission, welches ungleichmässige Kurvenverläufe zur Folge hat, wird verhindert. Der Einsatz dieser Sonde sicherte einen gleichmässigen Kurvenverlauf und erhöhte die maximale Fluoreszenz, so dass das Protokoll für die vorgesehene Anwendung genutzt werden konnte.

Der entwickelte Test erwies sich als geeignet für die in der vorliegenden Arbeit vorgesehene Nutzung zur Absicherung der Befunde nach Infektion mit APMV-1 599 und Herts 33 / 56. Bezüglich einer breiten diagnostischen Anwendbarkeit des Protokolls sind jedoch weitergehende Überprüfungen notwendig.

Um den entwickelten Test universell und für ein breites Anwendungsspektrum der Diagnostik von aviärem Paramyxovirus 1, insbesondere zum Nachweis von Virus aus Feldproben, zu nutzen ist es nötig, die Sensitivität und Spezifität sowie die diagnostische Sensitivität des Assays weiter zu überprüfen und zu validieren. Hierfür sollte eine Zusammenstellung von Stämmen eines möglichst breiten Spektrums von Genotypen beider Genklassen sowie geeignete Kontrollen mittels des entwickelten Protokolls evaluiert werden.

Die Sensitivität wurde anhand der Ermittlung der Abweichungen von der etablierten Methode nach WISE et al, 2004 überprüft. Aufgrund der geringen Abweichungen ist anzunehmen, dass die Nachweisgrenze der detektierten Kopienzahlen ähnlich ist, welche bei dem Protokoll nach WISE et al. (2004) bei maximal 10^3 Genomkopien,

beziehungsweise 10^1 EID₅₀ liegt. Die Wertung der Proben als positiv bei einem cT Wert von unter 35 hat einen Sensitivitätsverlust zur Folge, im Hinblick auf das Kontaminationsrisiko dieser hochsensitiven Methode durch stark virushaltige Proben wurde dieser aber zugunsten der Ergebnissicherheit in Kauf genommen.

Die Untersuchung der entnommenen Organe erfolgte anhand beider RRT-PCR Protokolle. Der Einsatz eines Protokolls, welches nicht routinemässig angewandt wird, wie in diesem Fall die RRT-PCR auf dem NP-Gen, erlaubte eine Erkennung methodisch bedingter Schwankungen der Fluoreszenz und lieferte eine zusätzliche Überprüfung und Bestätigung der Ergebnisse. Durch die semiquantitative Beurteilung der Ergebnisse der beiden Protokolle im Durchschnitt wurden auch Ergebnisse in Grenzbereichen erfasst und als solche dargestellt. Insbesondere sind hier Ergebnisse mit einem semiquantitativen Index von 0,5 zu erwähnen, die in einem der Untersuchungsprotokolle einen cT Wert von unter 35, in dem anderen Untersuchungsprotokoll von über 35 aufwiesen. Diese Organe sind als sehr schwach positiv zu werten. Unter Berücksichtigung der Negativkontrollen sowie der Bewertung der Proben als positiv erst ab einem cT Wert von unter 35 ist jedoch von einer ausreichenden Ergebnissicherheit einer positiven Wertung auszugehen.

5.2 Klinik und Virustropismus

Entgegen der bisherigen Beobachtungen nach der Eiinokulation mit letogenen Stämmen, die den Tod der Embryonen und somit einen deutlichen Abfall der Schlupfrate bewirkten (DILAVÉRIS et al, 2007; MAST et al, 2005) kam es in der durchgeführten Studie zu überlebenden, infizierten und geschlüpften Tieren. Dies ist einerseits mit dem Zeitpunkt der Impfung, andererseits mit der abgeschwächten Virulenz des verwendeten Stammes zu begründen. Auch bei der mit dem klassischen Impfstamm Clone 30 beimpften Kontrollgruppe kam es zu geschlüpften infizierten Tieren, die jedoch aufgrund der Restvirulenz des Impfvirus innerhalb der ersten zehn Lebensstage starben. Dieser Vergleich legt nahe, dass die gegenüber von Clone 30 reduzierte Virulenz des Stamms APMV-1 599 ursächlich für das Überleben der in ovo mit APMV-1 599 infizierten Tiere ist. Trotz abgeschwächter Virulenz ist nach in ovo Infektion aber eine deutliche Restvirulenz zu verzeichnen, was anhand der massiven klinischen Beeinträchtigung und der damit assoziierten

reduzierten Überlebensrate der Versuchsgruppe von 45,9% während der ersten zehn Lebenstage im Vergleich zu der von 95% der Kontrollgruppe ersichtlich ist. Durch die im Vorversuch vorgenommene Titration sowie die Abklärung der Infektionsrate durch Probennahmen am ersten Lebenstag wurde eine möglichst vollständige Infektionsrate gesichert. Weiterhin wurde aus allen gestorbenen oder moribund getöteten Tieren Virus nachgewiesen, so dass bei den klinisch deutlich erkrankten Tieren der Versuchsgruppe von einem virusassoziierten klinischen Bild ausgegangen werden kann. In Eintagsküken vermochte der lentogene Virusstamm APMV-1 599 selbst bei systemischer Applikation im Rahmen der Ermittlung des intracerebralen Pathogenitätsindex nicht, klinische Symptome auszulösen (GRUND et al, 2002). Auch die Sentineltiere, die erst nach dem Schlupf Viruskontakt hatten, wiesen nur in wenigen Fällen eine Beeinträchtigung durch das Virus auf.

Diese Parameter deuten darauf hin, dass immunologische Abwehrmechanismen, die sich während der letzten drei Tage der Embryonalentwicklung des Huhnes ausbilden, die Empfänglichkeit geschlüpfter Küken für eine Virusinfektion verringern. Diese Argumentation wird gestützt vom Nachweis einer schnellen angeborenen Immunantwort im Gastrointestinaltrakt, die zwar während der ersten zwei Lebenswochen einer Reifung unterliegt, trotzdem aber sofort nach dem Schlupf in der Lage ist, die Tiere vor den klinischen Folgen der plötzlichen bakteriellen Besiedelung des Darms zu schützen (BAR-SHIRA & FRIEDMAN, 2006). Die in der Arbeit erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Abwehrmechanismen des Embryos noch nicht ausreichen, um lentogenes APMV-1 so wirkungsvoll zu limitieren, dass ein Schutz der Tiere vor Spätfolgen nach dem Schlupf gewährleistet ist. Die dabei zum Tragen kommenden Mechanismen der Immunitätsentwicklung des Hühnerembryos sind noch weitgehend ungeklärt, so dass weitere Grundlagenforschung benötigt wird, um den Einfluss der embryonalen Immunität auf Paramyxoviruskontakt zu einem sehr frühen Zeitpunkt abschliessend zu bestimmen.

Auch hinsichtlich des Virustropismus zeigte das verwendete Impfvirus APMV-1 599 Unterschiede zu bisherigen Studien mit unterschiedlichen lentogenen Virusstämmen, die sowohl an Hühnerembryonen als auch an geschlüpften Tieren durchgeführt wurden. Es wurde nach in ovo Infektion mit APMV-1 599 mittels RRT-PCR virale RNA in einer Vielzahl der beprobten Organe nachgewiesen. Die maximale Viruslast wurde mittels RRT-PCR in der Phase der klinischen Erkrankung während der ersten

acht Tage nach dem Schlupf nachgewiesen. Insbesondere wurde wiederholt Virus systemisch in Leber und ZNS lokalisiert, wenngleich die dort nachgewiesene Viruslast sich signifikant geringer zeigte als in der Lunge und in Zäkum / Zäkaltonsille, in denen die höchste Viruslast auftrat.

Im Unterschied dazu konnten vorangegangene Studien, die den Virustropismus lentogener Virusstämme im Hühnerembryo nach Allantoishöhlenbeimpfung mittels Immunfluoreszenz und in situ Hybridisierung untersuchten, lediglich einen Virusnachweis auf den Epithelien des Gastrointestinaltraktes sowie auf dem endothelialen Blatt der Eihäute nachweisen (HUANG et al, 2004; NAGAI et al, 1979; OLDONI et al, 2005).

Nach intrakonjunktivaler Applikation von lentogenem Lebendvirus bei geschlüpften Tieren und anschliessender Untersuchung mittels Real-time RT-PCR war virale RNA hingegen auch systemisch im Myocard und auf den Luftsackepithelien in geringen Mengen nachzuweisen (BROWN, 1999), wobei dies keine oder nur eine geringgradige klinische Symptomatik hervorrief und nicht mit verstärkten Verlusten einherging.

Im Anschluss an die klinische Phase konnte bis zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion keine virale RNA mehr aus Versuchs- oder Sentinelgruppe nachgewiesen werden. Es ist also von der Elimination des Impfvirus nach Abklingen der klinischen Symptome auszugehen. Hinweise für eine Persistenz, wie sie bei anderen Viren der Familie *Paramyxoviridae*, insbesondere Morbiliviren, vorkommt (RIMA & DUPREX, 2005; STETTLER, 1997) geben die durchgeführten Untersuchungen nicht.

Insbesondere bemerkenswert ist der Nachweis von geringen Virusmengen in Gehirn und Leber, was für eine Abweichung von der bisher propagierten ausschliesslichen lokalen Präsenz des Virus auf dem Endothel spricht.

Es besteht die Möglichkeit, dass diese Unterschiede im Nachweis aus Organen durch die gewählte Methodik bedingt sind. Während bisherige in ovo Studien Immunfluoreszenz (NAGAI et al, 1979, OLDONI et al, 2005), in situ Hybridisierung (OLDONI et al, 2005) und die Expression von „green fluorescent protein“ (GFP) (AL-GARIB et al, 2003) zur Detektion des Virus nutzten bietet die Real-Time RT-PCR die Möglichkeit eines sehr sensitiven Nachweises, der unabhängig von Virusreplikation virale RNA detektiert. Vergleichsstudien der RRT-PCR mit den anderen angeführten Methoden hinsichtlich der Sensitivität der Methoden wurden

nicht durchgeführt. Die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zum Virustropismus lentogener APMV-Stämme bei Embryonen oder geschlüpften Tieren beziehen sich jedoch alle auf die Untersuchung an klinisch unauffälligen Tieren. Daher ist die in dieser Studie sehr ausgeprägte klinische Symptomatik nach in ovo Infektion mit 599 indikativ für Unterschiede, die nicht ausschliesslich auf methodischen Differenzen basieren.

Es werden in der Literatur verschiedene Mechanismen diskutiert, die einen Einfluss auf den Tropismus aviärer Paramyxoviren haben können. Die Stämme des Genotyps II, also auch der eingesetzte Stamm APMV-1 599, gelten als vorwiegend respirotrop (PEROZO et al, 2008a). Dies entspricht auch den Ergebnissen der Tropismusuntersuchungen im vorliegenden Versuch.

PEROZO et al. (2008a) wiesen durch Untersuchungen des respirotropen Impfstamms VG/GA und seines Klons 5, welcher einen Tropismus für den Gastrointestinaltrakt aufweist, Sequenzunterschiede in den für das HN sowie für das F-Protein kodierenden Bereichen nach.

Das HN Protein wird insbesondere hinsichtlich seiner Rolle im Zusammenhang mit Neurotropismus diskutiert (HUANG et al, 2004). Auch beim Masernvirus als weiterem Vertreter der Familie *Paramyxoviridae* wird das Hämagglutininprotein für Neurotropismus und Neurovirulenz verantwortlich gemacht (DUPREX, 1999). Die Bindung des HN Proteins erfolgt an sialinsäurehaltige Rezeptoren der Zielzelle. Eine durch diese Bindung bedingte Veränderung des Virustropismus ist also abhängig von der Struktur des HN, der Struktur des Rezeptors oder der Rezeptorverteilung im Organismus. Da weder die genaue Rezeptorstruktur noch deren Verteilung in embryonalen Körpergeweben des Huhnes bisher geklärt ist kann dahingehend keine Aussage getroffen werden.

Das F-Protein vermittelt die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran der Wirtszelle. Ursächlich für F-proteinbedingte Tropismusunterschiede ist die Spaltung des Proteins in seine funktionellen Untereinheiten F₁ und F₂. Diese erfolgt bei velogenen Stämmen mit polybasischer Spaltstelle durch ubiquitär vorkommende furinartige Proteasen. Bei lentogenen Stämmen mit monobasischer Spaltstelle sind jedoch trypsinerge kalziumabhängige Serinproteasen zur Spaltung notwendig. Tropismusunterschiede, die auf einer veränderten Funktionalität des F-Proteins beruhen lassen sich also zum einen durch Sequenzunterschiede im Bereich der F-

Proteinspaltstelle, zum anderen durch die Anwesenheit von Serinproteasen erklären. Die für die Spaltung des F-Proteins verantwortlich gemachte Serinprotease ist identisch mit dem Blutgerinnungsfaktor X, welcher in seiner inaktiven Form in einer Vielzahl von embryonalen Geweben, hauptsächlich in Leber und Milz, vorkommt. In seiner aktiven Form Faktor Xa liegt die Protease im Hühnerembryo nur auf den embryonalen Eihäuten und in der Allantois- und Amnionflüssigkeit vor (GOTOH et al, 1992). Dies bewirkt bei lentogenen Virusstämmen im Regelfall eine lokale Replikation auf den embryonalen Eihäuten, im Fruchtwasser und auf den gastrointestinalen Epithelien, die nicht zu einer systemischen Ausbreitung führt, erklärt aber auch einen Kontakt embryonaler Mukosae mit der aktiven Form des Virus.

TASHIRO et al (1992) wiesen hingegen auf den bronchialen Epithelien der Ratte eine von Clarazellen sezernierte trypsinartige Protease nach, die in der Lage war, die F Proteinspaltstelle von Sendavirus zu spalten. Bei einer massiven Replikation in der Lunge, von der beim durchgeführten Versuch aufgrund der nachgewiesenen Viruslast ausgegangen werden muss, ist die Präsenz einer trypsinartigen Protease im Respirationstrakt, die in der Lage ist, F-Protein mit monobasischem Spaltstellenmotiv zu spalten, wahrscheinlich.

Durch die Sequenzierung der für die F und HN Proteine kodierenden Gene von Virus, welches systemisch, also in Leber oder ZNS nachgewiesen wurde liessen sich Tropismusunterschiede aufgrund etwaiger Mutationen des Stamms APMV-1 599 oder der gezielte Selektion von furinabhängigen Quasispezies abklären.

Um eine umfassende Aussage über den sehr komplexen Prozess des Virustropismus in ovo und in vivo treffen zu können sind weitere Studien notwendig, die zum einen Veränderungen der F- und HN-kodierenden Sequenzen berücksichtigen, andererseits auch die Rezeptor- und Proteaseverteilung in Hühnerembryonen und geschlüpften Tieren erfassen.

Durch die vorgenommenen Untersuchungen ausgehend von der Allantoishöhleninokulation wurde eine systemische Ausbreitung von Virus nachgewiesen, der Eintragsweg des Virus in embryonale Gewebe kann mit den vorliegenden Ergebnissen aber nicht abschliessend geklärt werden. Auch Aussagen zum Zeitpunkt der Generalisierung sind nicht möglich, ausser dass diese während der Bruttage 18 bis 21 stattgefunden haben muss, da der Nachweis von viraler RNA

in systemischen Organen sowohl im Vorversuch als auch im Versuch bereits am ersten Lebenstag geführt wurde.

Zum einen ist ein hämatogener Eintrag des Virus über die Allantoisgefäße denkbar, der eine Virämie des Embryos und eine hämatogene systemische Ausbreitung zur Folge hätte. Eine Voraussetzung für den Eintrag in den embryonalen Blutkreislauf wäre eine Schädigung der Gefäßwände, was anhand der massiven Replikation lentogener Viren auf dem entodermalen Blatt der Chorioallantoismembran möglich erscheint.

Eine weitere Möglichkeit des Viruskontaktes mit den embryonalen Epithelien besteht durch eine respiratorische Infektion beim Durchstossen des Embryos in die Luftkammer am 19. bis 20. Bebrütungstag kurz vor dem Schlupf. Mit diesem Vorgang beginnt der Prozess der Lungenatmung, was ein Lösen der Verklebungen der Alveolen, die im Embryonalstadium vorliegen, zur Folge hat. Weiterhin ist zu diesem Zeitpunkt ein Kontakt des Embryos mit Allantoisflüssigkeit und der Chorioallantoismembran, die als Hauptreplikationsorte für lentogene Paramyxovirusstämme gelten (GOTOH et al, 1990), gegeben. Es ist also vom Einatmen von Virus ab diesem Zeitpunkt auszugehen. Für diese Erklärungsmöglichkeit des Eintrags spräche auch der massive Nachweis von viraler RNA in der Lunge der Versuchstiere ab dem erstem Lebenstag.

Eine dritte Möglichkeit des Eintrags ist das Abschlucken von Virus zusammen mit der Amnionflüssigkeit und systemischen Eintrag über den Gastrointestinaltrakt. In diesem Fall ist ein zusätzlicher Eintrag von Virus aus der Allantois- in die Amnionhöhle notwendig.

In letzteren beiden Fällen wäre zusätzlich die Überschreitung der Epithelbarriere des Respirations- bzw. Gastrointestinaltraktes mit anschliessender Virämie der Tiere für einen Eintrag in die systemischen Organe notwendig.

Dieser erscheint plausibel in Anbetracht der Schädigungen des trachealen Epithels, die nach einer embryonalen Infektion mit Paramyxovirus histologisch sichtbar sind (LAM, 2003; MAST et al, 2005). Hinsichtlich des Nachweises von viraler RNA in der Leber ist auch eine mögliche aufsteigende Infektion aus dem Gastrointestinaltrakt über den Gallengang zu berücksichtigen.

Als hauptsächliche Barriere zur Überschreitung der Epithelien wird eine mukosale Immunantwort durch IgA auf den Epithelien des Gastrointestinal- und Respirationstraktes diskutiert (PEROZO et al, 2008b). Aufgrund der Annahme, dass

doch die funktionelle Unreife der B- und T- Lymphozyten des GALT noch kein vollständiger immunologischer Schutz durch das humorale Immunsystem im Embryonal- und frühen Kükenstadium gewährleistet ist, sondern die Epithelien des Gastrointestinaltraktes hauptsächlich durch zelluläre Immunantwort geschützt sind (BAR-SHIRA et al, 2003; BAR-SHIRA & FRIEDMAN, 2006; MAST & GODDEERIS, 1999), ist auch eine verspätete Entwicklung der Kompetenz der mukosalen Immunantwort anzunehmen. Es sind jedoch lediglich unzureichende Untersuchungen zu der immunologischen Entwicklung während der Embryonalentwicklung vorhanden, so dass zum momentanen Zeitpunkt weder abschliessende Aussagen über die mukosale IgA Antwort auf embryonalen Epithelien noch über deren Barrierewirkung für Erreger getroffen werden kann.

Die Untersuchungen der Organe mittels RRT-PCR weisen zwar virale RNA in den betroffenen Organen nach, diese muss aber nicht notwendigerweise mit einer aktiven Virusreplikation in den Zielorganen assoziiert sein. Die Replikationsfähigkeit lentogener aviärer Paramyxoviren ist entscheidend von der Spaltung des Fusionsproteins durch trypsinerge Proteasen abhängig (GARTEN et al, 1980; ROTT et al, 1985). Im Falle einer hämatogenen Abschwemmung replikationsfähigen Virus kann dieses also nur einen Replikationszyklus im Zielorgan trypsinunabhängig durchlaufen. Da die bei den Versuchstieren nachgewiesene Viruslast in den systemischen Organen, insbesondere im ZNS, sehr gering ist, ist die Hypothese eines einfachen Replikationszyklus, wie sie auch von OGASAWARA et al (1992) vertreten wird, auch im vorliegenden Versuch wahrscheinlich.

5.3 Ausscheidung

Pre-challenge

Die Ausscheidung vor der Belastungsinfektion wurde durch zwei Parameter, die Entnahme von Kotproben sowie das Zustellen von Sentineltieren, abgeklärt. Über den Zeitraum der klinischen Infektion während der ersten acht Lebenstage erfolgte eine Virusausscheidung über die Kloake, da beim Grossteil der beprobten Tiere über diesen Zeitraum Virus im Kot nachzuweisen war. Eine Ausnahme bildeten hier die beiden am dritten Lebenstag beprobten Tiere, bei denen trotz Virusnachweis in den Organen kein Virus im Kot nachgewiesen werden konnte. Es ist also davon auszugehen, dass trotz eines akuten Infektionsgeschehens nicht durch alle Tiere zu

allen Zeitpunkten Virus ausgeschieden wird. Der Nachweis der Infektiosität des ausgeschiedenen Virus erfolgte durch das Zustellen von Sentineltieren am ersten Lebenstag. Bei experimenteller Infektion adulter Papageienvögel mit demselben Stamm konnte die Infektiosität des ausgeschiedenen Virus nicht nachgewiesen werden (MOHN, 2005).

In der vorliegenden Studie liessen sich die zugestellten Sentineltiere nahezu vollständig durch die Ausscheidungen der Tiere der Versuchsgruppe infizieren. Diese Aussage basiert auf den Virusnachweis bei zwei der drei Sentineltiere, die während der ersten acht Tage beprobt wurden, auf dem Nachweis von spezifischen Antikörpern in den Sentineltieren sowie der von diesen entwickelten nahezu vollständigen protektiven Immunität nach einer Belastung mit dem velogenen Newcastle Disease Virusstamm Herts (Weybridge 33 / 56). Eines der zugestellten Sentineltiere entwickelte keine protektive Immunität und wurde aufgrund klinischer Symptome fünf Tage nach Belastungsinfektion getötet. Bei diesem Tier war Virus in Zäkaltonsille und Kot nachweisbar, was belegt, dass der Kontakt zu den infizierten Tieren nicht ausreicht, um eine vollständige protektive Immunität in ungeimpften Tieren zu induzieren.

Post-challenge

Die Virusausscheidung nach Belastungsinfektion wurde analog zu den Untersuchungen nach in ovo Infektion zum Einen durch die Entnahme von Tupferproben, zum Anderen durch das Zustellen von uninfizierten, ungeimpften Tieren („Ausscheidungssentinels“) abgeklärt.

Der Nachweis von viraler RNA in den Tupferproben aller ungeimpften Kontrolltiere lässt auf die Ausscheidung von Virus durch diese Tiere schliessen. Für die Ausscheidung von infektiösem Virus spricht ebenfalls, dass eines der Ausscheidungssentinels sich durch direkten Kontakt infizieren liess und klinisch erkrankte. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass nicht alle Kontakttiere zur Kontrollgruppe infiziert wurden, was durch das Ausscheiden zu geringer Mengen infektiösen Virus bedingt sein kann. Die Haltungsbedingungen, die einen direkten fäkal-oralen Kontakt nicht zulassen, die haltungsbedingte geringe Staubbildung in den Isolatoren sowie das Entfernen aller infizierten Tiere beim Auftreten massiver klinischer Symptome sind jedoch ebenfalls bei der geringen Infektionsrate der Ausscheidungssentineltiere zu berücksichtigen.

Im Gegensatz hierzu steht die in ovo infizierte Versuchsgruppe, bei der zu keinem Zeitpunkt virale RNA im Tupfermaterial nachweisbar war. Auch bei den der Versuchsgruppe zugestellten Ausscheidungssentinelns waren bis zum Versuchsende dreizehn Tage nach Belastungsinfektion weder virale RNA oder APMV-spezifische Antikörper nachzuweisen. Dies spricht für eine deutlich reduzierte Ausscheidung über die Kloake, möglicherweise sogar eine durch die in ovo Impfung mit APMV 599 induzierte sterile Immunität.

Aus der Gruppe der Sentineltiere liess sich trotz fehlender klinischer Symptomatik aus drei der zehn Tupferproben, die vier Tage post challenge genommen wurden, virale RNA nachweisen. Die Ausscheidung der Sentineltiere verlief verzögert im Vergleich zu den Tieren der ungeimpften Kontrollgruppe, bei der die Ausscheidung bereits zwei Tage post Challenge nachgewiesen wurde. Die Höhe der Viruslast in den Tupferproben unterschied sich nicht von der der Kontrollgruppe. Es wird also von der Sentinelgruppe trotz klinischer Protektion Virus ausgeschieden, wenngleich die ausgeschiedene Menge nicht vermochte, unter den gegebenen Haltungsbedingungen die ungeimpften Ausscheidungskontrolltiere zu infizieren.

Dreizehn Tage nach Belastungsinfektion wurde aus keiner der Kotproben der beprobten Tiere mehr virale RNA nachgewiesen.

Es wurden bislang nur wenige umfassende Studien zu Ausscheidungshäufigkeit und ausgeschiedener Virusmenge von Newcastle Disease Virus durchgeführt. Die ausgiebigste dahingehende Untersuchung stammt von MILLER et al. (2007), hier wurde nach Impfung mit fünf verschiedenen Stämmen und anschliessender Belastung mit dem velogen viscerotropen Stamm CA02 die oropharyngeale und kloakale Ausscheidung ermittelt. Hier zeigte sich in Abhängigkeit der Homologie von Impf- und Belastungsstamm eine deutliche oropharyngeale Ausscheidung, die von einer länger andauernden kloakalen Ausscheidung mit geringerer Viruslast abgelöst wurde.

Auch KAPCZYNSKI & KING (2005) zeigten Ausscheidung des velogenen Stammes CA02 trotz Impfung. Auch hier wurde Virus sowohl oropharyngeal als auch kloakal bis zum neunten Tag nach Belastungsinfektion von Einzeltieren ausgeschieden, wenngleich die Viruslast der oropharyngealen Ausscheidung höher war.

Im Vergleich dazu zeigten Studien zur Ausscheidung von velogenen Hühnerstämmen an anderen Spezies eine verlängerte Ausscheidung von bis zu 20

Tagen ohne sichtbare klinische Symptome. DE OLIVEIRA TORRES CARRASCO et al (2008) wiesen bei experimentell infizierten ungeimpften Tauben mittels RRT-PCR eine Dauer der Virusausscheidung von 20 Tagen mit einem Ausscheidungsmaximum an den Tagen 11-13 nach Infektion bei einem Ausbleiben von klinischen Symptomen nach. Auch KUIKEN et al (1998) wiesen in experimentell infizierten Kormoranen eine anhaltende Virusausscheidung von bis zu 28 Tagen nach, die nicht notwendigerweise mit klinischen Symptomen einherging.

Maskierte Infektionsverläufe, wie sie auch bei den Sentineltieren im durchgeführten Versuch zu beobachten waren, bergen die Gefahr einer Verschleppung von velogenem Virus und somit einem Eintrag in bislang unbetroffene Bestände. In Anbetracht des Einsatzes eines in ovo Impfstoffes gegen Newcastle Disease betonen diese Ergebnisse die Notwendigkeit einer möglichst kompletten Immunisierung der Tiere zum Schlupfzeitpunkt, worauf in der durchgeführten Studie Wert gelegt wurde.

Die von DILAVÉRIS et al (2007) propagierte in ovo Impfung von Einzeltieren und anschließende Durchseuchung der Herde durch ausgeschiedenes Virus der Impflinge ist im Falle des Stammes 599 nicht zu empfehlen. Nicht nur muss eine unvollständige und unkontrollierte Immunisierung durch ausgeschiedenes Impfvirus befürchtet werden, die vorliegenden Ergebnisse legen auch nahe, dass Tiere, deren Immunisierung lediglich durch Kontakt mit in ovo Impflingen erfolgte, eine erhöhte Ausscheidungsrate von Challengevirus aufweisen.

5.4 Humorale und zelluläre Immunantwort

Die Ergebnisse des kommerziellen ELISA zeigen weder bei den Tieren der Versuchs- noch bei denen der Sentinelgruppe eine deutliche Serokonversion vor der Belastungsinfektion. Lediglich eines der Sentineltiere war am 21. Lebenstag als sicher positiv zu werten, ein weiteres Tier der Versuchsgruppe wies ein fragliches Ergebnis auf. Auch nach der Belastungsinfektion und somit dem zweiten Viruskontakt der Tiere konnten mittels ELISA bei sieben der 27 beprobten Versuchstiere keine spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Dies weicht ab

von der Untersuchung mittels HAH, bei der vereinzelt ab dem 7. Lebenstag serokonvertierte Tiere auftraten. An den Lebenstagen 14 und 21 wurde dann mittels HAH in allen Serumproben spezifische hämagglutinationshemmende Antikörper nachgewiesen. Dies entspricht den Vorgaben des europäischen Rates, der nach Impfung mit inaktivierten Impfstoffen einen HAH-Titer von $4,0 \log_2$ oder höher fordert. Für die Impfung mit Lebendimpfstoffen bestehen dahingehend keine Vorgaben (European Pharmacopoeia, 2007). Auch RAUTENSCHLEIN et al (1999) wiesen nach in ovo Inokulation von spf-Puteneiern eine Induktion NDV-spezifischer Antikörper bereits am siebten Lebenstag nach. Der deutliche Unterschied zwischen ELISA und HAH bei der Bewertung von Proben vor der Belastungsinfektion steht im Kontrast zu Untersuchungen von DE WIT et al (1992), die eine sehr starke Korrelation beim Vergleich von HAH und ELISA zum Nachweis von Newcastle Disease Antikörpern nachwiesen. Auch von ADAIR et al (1989) durchgeführte vergleichende Untersuchungen zu HAH und Vollvirusantigen-ELISA zeigten eine deutliche Korrelation der beiden Testsysteme, wobei sich der ELISA als sensitiver erwies. Die von PIELA et al (1984) durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis von NDV Antikörpern im Dotter zeigten ebenfalls eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse von HAH und ELISA. Sowohl ELISA als auch HAH sind als validierte und zur Diagnostik von Antikörpern gegen die Newcastle Disease zugelassene Methoden etabliert.

Die Überprüfung mittels Western Blot zeigte eine deutliche Seroreaktivität bei vier von fünf Proben der Versuchstiere am 14. Lebenstag und einem von zwei Sentineltieren, die hauptsächlich gegen das Fusionsprotein gerichtet war. Die Reaktivität im Western Blot war in allen Fällen mit sehr geringer Hintergrundsreaktivität verbunden.

Diese Unterschiede dieser Ergebnisse sind mit grosser Wahrscheinlichkeit methodisch bedingt. Während bei enzymverstärkten Tests wie ELISA und Western Blot gebundenes, denaturiertes Antigen erkannt werden soll basiert der Hämagglutinationshemmungstest auf der Erkennung von Virusoberflächenantigenen in ihrer natürlichen Konformation. Auch eine antigenspezifische Abweichung der Ergebnisse ist denkbar. LEUWERKE et al (2008) demonstrierten diese sehr deutlich beim Nachweis von Antikörpern gegen das Schweineinfluenzavirus im direkten Vergleich von ELISA und HAH.

Weiterhin ist der genutzte ELISA ein kommerzieller Test zum Nachweis von Antikörpern gegen Newcastle Disease Virus beim Geflügel, der hauptsächlich zur Überprüfung des Impferfolgs entwickelt wurde. Bei kommerziell gehaltenen Tieren ist von einer deutlich höheren unspezifischen Seroreaktivität auszugehen als bei den im vorliegenden Versuch genutzten einmalig geimpften spf-Tieren. Dies ist bedingt durch die Präsenz von Antikörpern gegen eine Vielzahl von Impferregern und Umweltkeimen sowie durch die Prozessierung der Blutproben. Deshalb ist davon auszugehen, dass der kommerzielle ELISA im Prozess seiner Validierung an die Anwendung für Wirtschaftsgeflügel und die Nutzergruppe der Wirtschaftsgeflügelhalter angepasst wurde und die Nachweissensitivität zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen herabgesetzt wurde. Die durchgeführte Kombinationsuntersuchung mit HAH und ELISA erscheint also sinnvoll.

Ein Zusammenhang vom gebildeten Antikörpertiter nach kommerzieller Impfung und ausgeschiedener Virusmenge nach Belastungsinfektion wurde von VAN BOVEN et al (2008) nachgewiesen. Für die wirkungsvolle Verhinderung einer Transmission ist laut dieser Arbeitsgruppe ein hämagglutinationshemmender Antikörpertiter von $3 \log_2$ bei mindestens 85% der Herde notwendig, was im durchgeführten Versuch erreicht wurde.

Sowohl MAST & GODDEERIS (1999) als auch BAR-SHIRA et al (2003) propagieren eine immunologische Unreife im Embryonalstadium und kurz nach dem Schlupf. BAR-SHIRA et al (2003) wies eine der humoralen Immunität vorausgehende und für die Ausbildung dieser notwendige zelluläre Immunität des Gastrointestinaltrakts nach. Von NEGASH et al (2004) wird demgegenüber die Fähigkeit des 18 tägigen Embryos zur angeborenen und erworbenen Immunantwort ohne Beeinträchtigung der Immunkompetenz des geschlüpften Kükens beschrieben. Diese gegensätzlichen Beschreibungen lassen annehmen, dass die embryonale Immunantwort möglicherweise stark antigenabhängig ist.

Auch die Nachweisbarkeit von Antikörpern nach in ovo Impfung scheint antigenabhängig zu sein. So ist nach Impfung gegen die Mareksche Krankheit eine höhere Serokonversionsrate als bei der klassischen Impfung am ersten Lebenstag nachgewiesen, wobei die Tiere auch höhere Antikörpertiter erreichten (HESS et al, 2004). Auch die in ovo Impfung gegen aviäres Metapneumovirus induzierte eine

höhere Antikörperentwicklung mit früher einsetzender Immunität als die Impfung am ersten Lebenstag (TARPEY & HUGGINS, 2007).

Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen von HAYGREEN et al (2006), der eine in ovo Immunisierung mit einem Plasmidvektor, der das virale VP2 Protein des Infektiösen Bursitis Virus (IBDV) exprimieren sollte. Nach Immunisierung, nach Reimmunisierung und nach Challenge wurden zu keiner Zeit IBDV-spezifische Antikörper nachgewiesen. Dennoch schützte die Immunisierung vor einer Belastungsinfektion mit virulentem IBDV. Dies führten die Autoren auf eine zelluläre statt einer humoralen Immunantwort zurück. Infektionsversuche an cyclophosphamid-behandelten Tieren wiesen eine zelluläre Immunität nach, die antikörperunabhängig vor einer Belastung mit IBDV schützte (YEH et al, 2002).

REYNOLDS & MARAQA (2000) zeigten anhand der Immunisierung von Hühnern mit SDS-behandeltem Newcastle Disease Virus, dass eine zellvermittelte Immunität allein nicht ausreicht, um vor der Belastungsinfektion mit velogenem Virus zu schützen. Zusätzlich zu der T-Lymphozytenantwort sind neutralisierende Antikörper notwendig, um effizient vor klinischer Infektion mit dem velogenen Stamm Texas GB zu schützen.

Eine Immuntoleranz mit persistierender Virämie, wie sie bei der in ovo Impfung von Hühnern in unterschiedlichen Bebrütungsstadien mit Gallinem Herpesvirus 2 (Mareksche Krankheit) beobachtet wurde (SHARMA & BURMESTER, 1982; ZHANG & SHARMA, 2003) ist für die Impfung mit Newcastle Disease Virus nicht beschrieben. Mutmasslich hätte eine persistierende Virämie mit NDV auch den Tod der Embryonen zur Folge.

Diese Studien implizieren, dass die Präsentation von Virusantigenen durch MHCII tragende Zellen und die darauffolgende Antikörperantwort zwar eine essentielle Rolle beim Aufbau einer protektiven Immunität spielt, die zelluläre Immunantwort jedoch eine wichtige unterstützende Funktion innehält.

Die zelluläre Immunantwort wurde im durchgeführten Versuch durch die Ermittlung des Lymphozytenstatus vor und nach der Belastungsinfektion berücksichtigt. Gemessen wurden die prozentualen Anteile der T-Lymphozyten, T-Helferzellen, B-Lymphozyten und der übrigen antigenpräsentierenden Zellen an der Gesamtlymphozytenpopulation. Demnach sind Veränderungen in einer Lymphozytenpopulation immer in Relation zu den anderen Gruppen zu sehen.

Anhand der vorliegenden Daten scheinen die Tiere der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion nicht zu einer zellulären Infektionsabwehr imstande zu sein. Der relative Anstieg der CD4 markierten T-Lymphozyten ist sehr wahrscheinlich auf den Abfall der restlichen Lymphozytenpopulationen zurückzuführen. Die Tiere hatten damit weder humorale noch zelluläre Möglichkeiten, das Virus zu eliminieren und starben infolge dessen schnell. Bei den Tieren der Versuchs- und Sentinelgruppe ist ein vergleichbares Lymphozytenmuster zu beobachten. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren ist zwei Tage nach der Belastungsinfektion ein starker Anstieg der CD4 markierten T-Helferzellen sowie der CD8 markierten cytotoxischen Zellen zu verzeichnen, während in Relation dazu die B-Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen abfallen. Dies deutet auf eine mögliche schnelle Aktivierung der während der Immunisierungsphase gebildeten T-Memoryzellen hin. Die Antwort der gebildeten B-Memoryzellen scheint dagegen verzögert, somit zeigt sich zwei Tage nach Challenge ein primärer Abfall dieser Zellen. Vier Tage nach Belastungsinfektion ist jedoch ein erneuter Anstieg der B-Lymphozyten zu verzeichnen, der anhält. Aus diesen Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass während der initialen Infektion mit APMV 599 sowohl T- als auch B-Memoryzellen gebildet wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass an der Ausbildung der protektiven Immunität nicht ausschliesslich die humorale Immunantwort beteiligt ist, sondern auch zelluläre Faktoren, insbesondere der Bildung von T-Memoryzellen eine tragende Rolle bei der Infektionsabwehr zukommt.

Als weitere wichtige Komponente der Immunabwehr gegen Newcastle Disease wird von PEROZO et al (2008) die mukosale IgA Antwort auf den Schleimhäuten des Respirations- und Gastrointestinaltrakts angeführt, die wahrscheinlich aufgrund lokaler Virusreplikation und die anschliessende Präsentation viralen Antigens gebildet werden (AL-GARIB et al, 2003).

Um die immunologischen Komponenten und ihre Rolle in der Infektionsabwehr in ovo applizierter Erreger zu berücksichtigen sind weitere Studien diesbezüglich nötig. Insbesondere die zelluläre und mukosale Immunantwort im Anschluss an die Erstimmunisierung wäre zu ermitteln.

5.5 Eignung als Impfstoff

Das lentogene Isolat 599 erwies sich zunächst hinsichtlich der erhaltenen Schlupfrate bei nahezu vollständiger Infektion als vielversprechend.

Auch die nach europäischem Arzneimittelrecht von lyophilisierten Newcastle Disease Lebendimpfstoffen eine protektive Immunität gefordert, die nach Belastungsinfektion mit 10^5 EID₅₀ des Stammes Herts (Weybridge 33 / 56) eine Abgangsrate von 10% bei den vakzinierten Tieren nicht überschreitet (European Pharmacopoeia, 2007) wurden von der einmaligen in ovo Immunisierung mit APMV-1 599 erfüllt.

Darüber hinaus bewirkte die in ovo Immunisierung die Induktion einer vollständigen protektiven Immunität, die weder mit einer klinischen Symptomatik noch mit Gewichtsverlust nach Belastungsinfektion einherging. Weiterhin wurde nach Belastungsinfektion mit dem velogenen Stamm Herts (Weybridge 33 / 56) bei der in ovo mit APMV-1 599 infizierten Tiergruppe im Vergleich zu den Sentineltieren und der Kontrollgruppe keine kloakale Virusausscheidung nachgewiesen.

Nach in ovo Infektion mit Clone 30 blieb in der durchgeführten Arbeit zwar die Schlupfrate im Vergleich zur Kontrollgruppe erhalten, die Infektion verursachte jedoch massive klinische Symptome, die letztendlich zum Tod der Tiere in den ersten zehn Lebenstagen führte. Bei der in ovo Infektion mit APMV-1 599 zeigte sich im Vergleich dazu zwar eine deutliche Abschwächung, wie sie auch schon im embryonierten Hühnerei sichtbar war (GRUND et al, 2002), nach der Beimpfung in die Allantoishöhle des embryonierten Hühnereis war jedoch ebenfalls eine Abgangsrate von 54,1% der geschlüpften Tiere während der ersten zehn Lebenstage zu verzeichnen. Als Hauptparameter gegen den Einsatz als in ovo Impfstoff spricht daher eine inakzeptable Ausfallrate aufgrund von Restvirulenz nach dem Schlupf.

Ein weiterer beachtenswerter Nachteil hinsichtlich der Eignung von APMV-1 599 als Impfstoff ist die schwache Bildung von Serumantikörpern. Diese könnte nach in ovo Impfung mit APMV-1 599 aufgrund schwacher Seroreaktivität Probleme beim vom Tierhalter geforderten Nachweis des Impferfolgs bereiten. Beim Einsatz eines kommerziellen ELISA Systems wies vor der Belastungsinfektion keines der Tiere der Versuchsgruppe eine positive Serumantwort auf. Beim Einsatz des Hämagglutinationshemmungstests war dagegen auch vor der Belastungsinfektion eine Serokonversion detektierbar. Diese Beobachtung legt Abwehrmechanismen

nahe, die sich innerhalb der letzten drei Bebrütungstage im Hühnerembryo ausbilden und das geschlüpfte Küken in den letzten drei Tagen der Embryonalentwicklung zunehmend resistent für die durch APMV-1 599 verursachten klinischen Erscheinungen macht. Gleichzeitig scheint die durch in ovo Applikation verursachte systemische Ausbreitung von APMV-1 599 aber auch eine besonders stabile Immunität zu induzieren, die nicht ausschliesslich auf der Bildung spezifischer Antikörper beruht.

Die sich während der Bruttage 18 bis 21 entwickelnden Mechanismen der Infektionsabwehr sind noch weitgehend ungeklärt. Zum vollständigen Verständnis der embryonalen Infektionsempfänglichkeit und -abwehr des Huhnes und somit zur gezielten und sicheren Anwendung von in ovo Impfstoffen gegen Newcastle Disease besteht sowohl im Bereich der Immunologie als auch im Bereich der molekularbiologischen Determinanten des Virustropismus noch Forschungsbedarf.

Dem durchgeführten Versuch mit dem Stamm APMV-1 599 ist also trotz der Tatsache, dass sich das Virus in seiner nativen Form nicht als in ovo Impfstoff eignet, durchaus Beachtung bei weiteren Ansätzen zur in ovo Impfstoffentwicklung zu schenken.

6. Zusammenfassung

Die klassischerweise beim Wirtschaftsgeflügel gegen das aviäre Paramyxovirus vom Serotyp 1 (APMV-1), den Erreger der anzeigepflichtigen Newcastle Disease, durchgeführte Impfung mit attenuiertem Lebendvirus wird zwischen dem ersten und dem 14. Lebenstag eingesetzt. Es wurden bisher etliche Bemühungen zur Entwicklung einer *in ovo* Impfung, unternommen, die jedoch nicht zum kommerziellen Einsatz kamen.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, einen im Eintagsküken apathogenen APMV-1 Stamm (APMV-1 599) hinsichtlich seines Infektionsverlaufs und seiner protektiven Wirkung nach Beimpfung in spf-Hühnereier zu untersuchen.

Die Beimpfung embryonierter Hühnereier am 18. Bebrütungstag mit 10^6 EID₅₀ des Stammes APMV-1 599 bewirkte eine nahezu vollständige Infektion aller geschlüpften Tiere bei einer Schlupfrate von 81,7% (98 geschlüpfte Tiere aus 120 Eiern). Die Schlupfrate einer im selben Brüter geschlüpften uninfizierten Sentinelgruppe betrug 60% (18 Tiere aus 30 Eiern), die einer uninfizierten Kontrollgruppe 95% (57 Tiere aus 60 Eiern).

Trotz des Erhalts der Schlupfrate zeigten die *in ovo* APMV-1 infizierten Tiere während der ersten zehn Lebenstage jedoch sehr deutliche klinische Krankheitszeichen in Form respiratorischer Symptome, Apathie, Diarrhoe und in wenigen Fällen zentralnervöser Störungen, die während der ersten acht Lebenstage zu einer Ausfallrate von 54,1% führten. Im Gegensatz dazu zeigten die zugestellten Sentineltiere trotz nachweislicher Übertragung des Virus durch die Versuchsgruppe nahezu keine klinischen Symptome und virusbedingten Abgänge.

Für die Untersuchung der Virusausbreitung wurde zur Erhöhung der Ergebnissicherheit neben einem etablierten Real Time RT-PCR Protokoll, welches einen Abschnitt des Matrixproteingens amplifiziert (WISE et al, 2004), ein weiteres Protokoll zur Amplifikation und Detektion eines Abschnitts am 5' Ende des Nukleoproteingens entwickelt. Der Einsatz von sechs konventionellen Nukleotiden der 5' Nukleasesonde durch „*locked nucleic acid*“ (LNA) Nukleotide erlaubte eine Sondenverkürzung von 25 auf 17 Basen. Daraus folgte eine Verbesserung der Sondenbindung an das spezifische Amplifikat, so dass sich die Leistungsfähigkeit des neu entwickelten Protokolls vergleichbar mit der bereits etablierten Methode zeigte.

In den *in ovo* APMV-1 infizierten Küken liess sich virale RNA während der ersten acht Tage nach dem Schlupf in einer Vielzahl von Organen nachweisen, wobei eine Prädilektion für Lunge und Zäkum / Zäkaltonsille vorlag. Bei zwölf Tieren wurde eine systemische Ausbreitung des Virus mit Nachweis viraler RNA in der Leber, sowie bei neun Tieren im Gehirn beobachtet. Nach Abklingen der klinischen Erkrankung war bei der Probennahme am 14. und 21. Lebenstag kein schwachvirulentes Virus mehr nachzuweisen.

Spezifische Antikörper wurden mittels Hämagglutinationshemmungstest ab dem siebten, mittels eines kommerziellen ELISA erst vereinzelt ab dem 21. Lebenstag nachgewiesen. Die Untersuchungen zur zellulären Immunantwort geben zudem Hinweise auf die Ausbildung von T-Memoryzellen. Die durch die einmalige Inokulation *in ovo* induzierte humorale und zelluläre Immunität war ausreichend, um nach einer Belastungsinfektion mit velogenem Newcastle Disease Virus am 21. Lebenstag alle Tiere der Versuchsgruppe und die meisten Tiere der Sentinelgruppe klinisch zu schützen. Eine Virusausscheidung nach der Belastungsinfektion wurde bei der *in ovo* infizierten Gruppe nicht festgestellt, während sowohl drei von zehn Tieren der Sentinelgruppe als auch alle Tiere der ungeschützten Kontrollgruppe nach Belastungsinfektion noch Virus ausschieden.

Aufgrund der beobachteten Schädigung der Küken ist eine Anwendung des APMV-1 Stammes 599 als *in ovo* Impfstoff in der angewandten Form auszuschliessen. Die Untersuchungen wiesen nach *in ovo* Beimpfung eine Generalisierung der Infektion und im Vergleich zu der Impfung geschlüpfter Küken eine erhebliche Beeinträchtigung der Tiere nach. Dies deutet auf Entwicklungsprozesse im Embryo während der letzten drei Tage der Brut hin, die entscheidend für die Infektionsabwehr sehr junger Tiere sind. Eine weitere Klärung dieser immunologischen Ereignisse wäre nicht nur für die Entwicklung einer *in ovo* Impfung für Newcastle Disease sondern auch im Hinblick auf potentielle Frühinfektionen mit anderen Erregern von grosser Bedeutung.

7. Summary

The vaccination against avian paramyxovirus of the serotype 1 (APMV-1), the highly contagious agent of Newcastle Disease, is usually conducted with live attenuated vaccine strains within the first two weeks after hatch. Multiple efforts have been made to develop an *in ovo* vaccine, yet none of the approaches proved suitable for an application in commercial poultry.

The aim of the performed study was to evaluate the strain APMV-1 599, which had proven apathogenic for day-old chicks, for its progress of infection and the induction of protective immunity after inoculation of *spf*-chicken eggs.

The inoculation of embryonated chicken eggs with 10^6 EID₅₀ of the APMV-1 599 strain at incubation day 18 caused an infection in virtually all hatched chicks at a maintained hatch rate of 81,7%, which was not substantially lower than that the 60% hatch rate of a group of uninfected sentinel animals that hatched in the same incubator and the hatch rate of 95% of an uninfected and separately hatched control group.

Although the hatch rate was not reduced, the animals that were infected *in ovo* with APMV-1 599 showed pronounced clinical signs during the first ten days after hatch. These manifested themselves in the form of respiratory symptoms, apathy, diarrhea and in sporadic cases central nervous impairments, which led to a mortality rate of 54,1% within the first eight days after hatch. Opposed to this, the affiliated sentinel animals showed neither distinct clinical signs nor a substantially elevated mortality rate despite the proven transmission of the virus by the animals of the *in ovo* infected group.

To determine the spread of the virus to numerous organs, a novel Real-Time RT-PCR protocol targeting an amplicate located at the 5' end of the nucleoprotein gene was established in addition to the published and validated method targeting a sequence on the matrix protein gene (WISE et al, 2004). Due to low fluorescence levels and irregular fluorescence curves, six of the conventional nucleotides incorporated into the 5' nuclease probe were replaced by "*locked nucleic acid*" (LNA) nucleotides. This led to a shortening of the probe from 25 to 17 bases and thus an improvement of probe hybridization. The newly developed assay showed a comparable performance to the previously established protocol.

During the first eight days after hatch, viral RNA was detectable in multiple organs with a predilection for lung and cecum / cecal tonsil. Viral RNA could also be detected in twelve of the liver samples as well as nine of the brain samples. Following the period of clinical impairment, no viral RNA was detectable in the samples from days 14 and 21.

Specific antibodies could be detected by hemagglutination inhibition test from day seven and from day 21 by commercial ELISA. Additionally, the evaluation of cellular immune response indicates the formation of t-memory cells in the *in ovo* infected group and the sentinel animals. One single inoculation of APMV-1 599 *in ovo* was sufficient to induce a humoral and cellular immune response to protect all *in ovo* infected and most of the sentinel animals upon challenge with velogenic NDV Herts (Weybridge 33 / 56) at day 21. Shedding of the challenge virus was not noted in the *in ovo* infected group, while three of the ten sampled sentinel animals as well as all the animals in the control group shed virus two and four days after challenge, respectively.

Due to the visible clinical impairment of the chicks, an *in ovo* vaccination with APMV-1 599 in the applied mode is not to be considered. The performed experiments demonstrated a generalization of the infection and severe clinical symptoms compared to the vaccination of animals after hatch. These results are indicative of embryonic developmental processes within the last three days before hatch, which are essential for the immunologic defense of very young chicks. A complete understanding of these ongoing immunological processes would not only be of importance for the development of *in ovo* vaccines against Newcastle Disease, but also in regard to potential early infections with other infectious agents.

8. Literaturverzeichnis

92/66/EWG Council Directive of 14 July 1992 introducing Community measures for the control of Newcastle disease, Official Journal L 260, 5.9.1992, p1.

Adair, B. M.; McNulty, M. S.; Todd, D.; Connor, T. J. & Burns, K. (1989). Quantitative estimation of Newcastle disease virus antibody levels in chickens and turkeys by ELISA, *Avian Pathol* **18**(1), 175-192.

Ahmad, J. & Sharma, J. M. (1993). Protection against hemorrhagic enteritis and Newcastle disease in turkeys by embryo vaccination with monovalent and bivalent vaccines, *Avian Dis* **37**(2), 485-491.

Ahmad, J. & Sharma, J. M. (1992). Evaluation of a modified-live virus vaccine administered in ovo to protect chickens against Newcastle disease, *Am J Vet Res* **53** (11), 1999-2004.

Al-Garib, S. O.; Gielkens, A. L. J.; Gruys, E.; Peeters, B. P. H. & Koch, G. (2003). Tissue tropism in the chicken embryo of non-virulent and virulent Newcastle diseases strains that express green fluorescence protein, *Avian Pathol* **32**(6), 591-596.

Aldous, E. & Alexander, D.J. (2001). Detection and Differentiation of Newcastle Disease Virus, *Avian Pathology* **30**, 117-128.

Aldous, E. W.; Collins, M. S.; McGoldrick, A. & Alexander, D. J. (2001). Rapid pathotyping of Newcastle disease virus (NDV) using fluorogenic probes in a PCR assay, *Vet Microbiol* **80**(3), 201--212.

Alexander, D.J. (1997), Newcastle Disease and other Paramyxoviruses.
In: *Diseases of Poultry*. Ed.: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Macdougald, L., Saif, Y. and Beard, C., Iowa State University Press, pp 63-92.

Alexander, D.J. (1989), Newcastle Disease. In: *A manual for isolation and identification of avian pathogens*, American Association of Avian Pathologists, Inc, Kennet Square, pp. 114-120.

Alexander, D.J. (2008), Newcastle Disease, other Avian Paramyxoviruses and Pneumovirus Infections. In: *Poultry Diseases*. Ed: Saif, Y., Blackwell Publishing, pp. 75-100.

Alexander, D. J. (2001), 'Gordon Memorial Lecture. Newcastle disease.', *Br Poult Sci* **42**(1), 5--22.

Alexander, D. J. (2000), 'Newcastle disease and other avian paramyxoviruses.', *Rev Sci Tech* **19**(2), 443--462.

Alexander, D. J. (1995), 'Newcastle disease in countries of the European Union.', *Avian Pathol* **24**(1), 3--10.

Antal, M.; Farkas, T.; Germán, P.; Belák, S. & Kiss, I. (2007), 'Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction detection of Newcastle disease virus using light upon extension fluorogenic primers.', *J Vet Diagn Invest* **19**(4), 400--404.

Appleyard, G. & Davis, G. B. (1983), 'Activation of Sendai virus infectivity by an enzyme in chicken amniotic fluid.', *J Gen Virol* **64** (Pt 4), 813--823.

Arora, A.; Kaur, H.; Wengel, J. & Maiti, S. (2008), 'Effect of locked nucleic acid (LNA) modification on hybridization kinetics of DNA duplex.', *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*(52), 417--418.

Avakian, A. P.; Wakenell, P. S.; Grosse, D.; Whitfill, C. E. & Link, D. (2000), 'Protective immunity to infectious bronchitis in broilers vaccinated against Marek's disease either in ovo or at hatch and against infectious bronchitis at hatch.', *Avian Dis* **44**(3), 536--544.

Bar-Shira, E. & Friedman, A. (2006), 'Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick.', *Dev Comp Immunol* **30**(10), 930--941.

Bar-Shira, E.; Sklan, D. & Friedman, A. (2003), 'Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period.', *Dev Comp Immunol* **27**(2), 147--157.

Barbezange, C. & Jestin, V. (2002), 'Development of a RT-nested PCR test detecting pigeon Paramyxovirus-1 directly from organs of infected animals.', *J Virol Methods* **106**(2), 197--207.

Beard, C. & Hanson, R. (1984), *Diseases of Poultry*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, chapter Newcastle Disease, pp. 452-470.

Beard, C. W. & Easterday, B. C. (1967), 'The influence of the route of administration of Newcastle disease virus on host response. 3. Immunofluorescent and histopathological studies.', *J Infect Dis* **117**(1), 66--70.

Behr, K.; Pöppel, M. & Reetz, G. (2008), *Geflügeljahrbuch 2008*, Zentralverband der deutschen Geflügelwirtschaft e.V., chapter Schutzimpfungen, pp. 196-204.

Berinstein, A.; Sellers, H. S.; King, D. J. & Seal, B. S. (2001), 'Use of a heteroduplex mobility assay to detect differences in the fusion protein cleavage site coding sequence among Newcastle disease virus isolates.', *J Clin Microbiol* **39**(9), 3171--3178.

van Boven, M.; Bouma, A.; Fabri, T. H. F.; Katsma, E.; Hartog, L. & Koch, G. (2008), 'Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination.', *Avian Pathol* **37**(1), 1--5.

Brown, C.; King, D. J. & Seal, B. (1999), 'Detection of a macrophage-specific antigen and the production of interferon gamma in chickens infected with Newcastle disease virus.', *Avian Dis* **43**(4), 696--703.

Brown, C.; King, D. J. & Seala, B. S. (1999), 'Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence.', *Vet Pathol* **36**(2), 125--132.

Brown, C. C.; King, D. J. & Seal, B. S. (1999), 'Comparison of pathology-based techniques for detection of viscerotropic velogenic Newcastle disease virus in chickens.', *J Comp Pathol* **120**(4), 383--389.

Brugh, M. & Beard, C. W. (1984), 'Atypical disease produced in chickens by Newcastle disease virus isolated from exotic birds.', *Avian Dis* **28**(2), 482--488.

Buchholz, C. J.; Retzler, C.; Homann, H. E. & Neubert, W. J. (1994), 'The carboxy-terminal domain of Sendai virus nucleocapsid protein is involved in complex formation between phosphoprotein and nucleocapsid-like particles.', *Virology* **204**(2), 770--776.

Capua, I.; Scacchia, M.; Toscani, T. & Caporale, V. (1993), 'Unexpected isolation of virulent Newcastle disease virus from commercial embryonated fowls' eggs.', *Zentralbl Veterinarmed B* **40**(9-10), 609--612.

Chambers, P.; Millar, N. S.; Bingham, R. W. & Emmerson, P. T. (1986), 'Molecular cloning of complementary DNA to Newcastle disease virus, and nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the haemagglutinin-neuraminidase and the large protein.', *J Gen Virol* **67** (Pt 3), 475--486.

Chen, J. & Wang, C. (2002), 'Clinical epidemiologic and experimental evidence for the transmission of Newcastle disease virus through eggs.', *Avian Dis* **46**(2), 461--465.

Cheville, N. F.; Stone, H.; Riley, J. & Ritchie, A. E. (1972), 'Pathogenesis of virulent Newcastle disease in chickens.', *J Am Vet Med Assoc* **161**(2), 169--179.

Chia, S. L.; Tan, W. S.; Shaari, K.; Rahman, N. A.; Yusoff, K. & Satyanarayanajois, S. D. (2006), 'Structural analysis of peptides that interact with Newcastle disease virus.', *Peptides* **27**(6), 1217--1225.

Clegg, R. M.; Murchie, A. I.; Zechel, A.; Carlberg, C.; Diekmann, S. & Lilley, D. M. (1992), 'Fluorescence resonance energy transfer analysis of the structure of the four-way DNA junction.', *Biochemistry* **31**(20), 4846--4856.

Cobaleda, C.; Muñoz-Barroso, I.; Sagrera, A. & Villar, E. (2002), 'Fusogenic activity of reconstituted newcastle disease virus envelopes: a role for the hemagglutinin-neuraminidase protein in the fusion process.', *Int J Biochem Cell Biol* **34**(4), 403--413.

Coletti, M.; Rossi, E. D.; Franciosini, M. P.; Passamonti, F.; Tacconi, G. & Marini, C. (2001), 'Efficacy and safety of an infectious bursal disease virus intermediate vaccine in ovo.', *Avian Dis* **45**(4), 1036--1043.

Collins, B. S. & Bratt, M. A. (1973), 'Separation of the messenger RNAs of Newcastle disease virus by gel electrophoresis.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(9), 2544--2548.

Collins, M. S.; Bashiruddin, J. B. & Alexander, D. J. (1993), 'Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity.', *Arch Virol* **128**(3-4), 363--370.

Coronel, E. C.; Takimoto, T.; Murti, K. G.; Varich, N. & Portner, A. (2001), 'Nucleocapsid incorporation into parainfluenza virus is regulated by specific interaction with matrix protein.', *J Virol* **75**(3), 1117--1123.

Creelan, J. L.; Graham, D. A. & McCullough, S. J. (2002), 'Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction.', *Avian Pathol* **31**(5), 493--499.

Creelan, J. L. & McCullough, S. J. (2006), 'Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 (APMV-1) from field cases using one-step real-time RT-PCR.', *Dev Biol (Basel)* **126**, 149--57; discussion 325-6.

Cross, G. M. (1991), 'Newcastle disease.', *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **21**(6), 1231--1239.

Cui, S.; Fung, Y. W.; Lau, L. T.; Liu, W.; Wang, Y.; Tong, G.; Chen, J. & Yu, A. C. H. (2007), 'Detection of Newcastle disease virus using nucleic acid sequence-based amplification.', *Biologicals* **35**(1), 13--18.

Czeglédi, A.; Ujvári, D.; Somogyi, E.; Wehmann, E.; Werner, O. & Lomniczi, B. (2006), 'Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications.', *Virus Res* **120**(1-2), 36--48.

Dilaveris, D.; Chen, C.; Kaiser, P. & Russell, P. H. (2007), 'The safety and immunogenicity of an in ovo vaccine against Newcastle disease virus differ between two lines of chicken.', *Vaccine* **25**(19), 3792--3799.

Doyle, T. (1927), 'A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus', *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* **40**, 144-169.

Dunon, D.; Allioli, N.; Vainio, O.; Ody, C. & Imhof, B. A. (1999), 'Quantification of T-cell progenitors during ontogeny: thymus colonization depends on blood delivery of progenitors.', *Blood* **93**(7), 2234--2243.

Dunon, D.; Allioli, N.; Vainio, O.; Ody, C. & Imhof, B. A. (1998), 'Renewal of thymocyte progenitors and emigration of thymocytes during avian development.', *Dev Comp Immunol* **22**(3), 279--287.

Duprex, W. P.; Duffy, I.; McQuaid, S.; Hamill, L.; Cosby, S. L.; Billeter, M. A.; Schneider-Schaulies, J.; ter Meulen, V. & Rima, B. K. (1999), 'The H gene of rodent brain-adapted measles virus confers neurovirulence to the Edmonston vaccine strain.', *J Virol* **73**(8), 6916--6922.

European Pharmacopoeia 6.0, Council of Europe (2007), Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe (EDQM).

Fellah, J.; Jaffredo, T. & Dunon, D. (2008), Development of the Avian Immune System in *Avian Immunology*, Elsevier Academic Press, pp. 51-65.

Ferreira, L.; Villar, E. & Muñoz-Barroso, I. (2004), 'Gangliosides and N-glycoproteins function as Newcastle disease virus receptors.', *Int J Biochem Cell Biol* **36**(11), 2344-2356.

Ficken, M. D.; Edwards, J. F.; Lay, J. C. & Tveter, D. E. (1987), 'Tracheal mucus transport rate and bacterial clearance in turkeys exposed by aerosol to La Sota strain of Newcastle disease virus.', *Avian Dis* **31**(2), 241--248.

French, E. L.; George, T. D. S. & Percy, J. J. (1967), 'Infection of chicks with recently isolated Newcastle disease viruses of low virulence.', *Aust Vet J* **43**(9), 404--409.

Gagic, M.; Hill, C. A. S. & Sharma, J. M. (1999), 'In ovo vaccination of specific-pathogen-free chickens with vaccines containing multiple agents.', *Avian Dis* **43**(2), 293--301.

Gallili, G. E. & Ben-Nathan, D. (1998), 'Newcastle disease vaccines.', *Biotechnol Adv* **16**(2), 343--366.

Garten, W.; Berk, W.; Nagai, Y.; Rott, R. & Klenk, H. D. (1980), 'Mutational changes of the protease susceptibility of glycoprotein F of Newcastle disease virus: effects on pathogenicity.', *J Gen Virol* **50**(1), 135--147.

Garten, W.; Kohama, T. & Klenk, H. D. (1980), 'Proteolytic activation of the haemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus involves loss of a glycopeptide.', *J Gen Virol* **51**(Pt 1), 207--211.

Gavrilenko, A. (2006), 'Entwicklung einer real-time multiplex multitube RT-PCR zur Differentialdiagnostik der Klassischen Schweinepest', PhD thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Gibson, U. E.; Heid, C. A. & Williams, P. M. (1996), 'A novel method for real time quantitative RT-PCR.', *Genome Res* **6**(10), 995--1001.

Glaser, L. C.; Barker, I. K.; Weseloh, D. V.; Ludwig, J.; Windingstad, R. M.; Key, D. W. & Bollinger, T. K. (1999), 'The 1992 epizootic of Newcastle disease in double-crested cormorants in North America.', *J Wildl Dis* **35**(2), 319--330.

Gotoh, B.; Ogasawara, T.; Toyoda, T.; Inocencio, N. M.; Hamaguchi, M. & Nagai, Y. (1990), 'An endoprotease homologous to the blood clotting factor X as a determinant of viral tropism in chick embryo.', *EMBO J* **9**(12), 4189--4195.

Gotoh, B.; Yamauchi, F.; Ogasawara, T. & Nagai, Y. (1992), 'Isolation of factor Xa from chick embryo as the amniotic endoprotease responsible for paramyxovirus activation.', *FEBS Lett* **296**(3), 274--278.

Grund, C. H.; Werner, O.; Gelderblom, H. R.; Grimm, F. & Kösters, J. (2002), 'Avian paramyxovirus serotype 1 isolates from the spinal cord of parrots display a very low virulence.', *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **49**(9), 445--451.

Grund, C.H. Bedeutung von schwach virulenten Aviären Paramyxoviren bei Psittaziden. Vet. Habil München 2004.

Hales, R. H. & Ostler, H. B. (1973), 'Newcastle disease conjunctivitis with subepithelial infiltrates.', *Br J Ophthalmol* **57**(9), 694--697.

HANSON, R. P. & BRANDLY, C. A. (1955), 'Identification of vaccine strains of Newcastle disease virus.', *Science* **122**(3160), 156--157.

Hanson, R. P. & Spalatin, J. (1978), 'Thermostability of the hemagglutinin of Newcastle disease virus as a strain marker in epizootologic studies.', *Avian Dis* **22**(4), 659--665.

Haygreen, E. A.; Kaiser, P.; Burgess, S. C. & Davison, T. F. (2006), 'In ovo DNA immunisation followed by a recombinant fowlpox boost is fully protective to challenge with virulent IBDV.', *Vaccine* **24**(23), 4951--4961.

Hess, M.; Huggins, M. B. & Heincz, U. (2004), 'Hatchability, serology and virus excretion following in ovo vaccination of chickens with an avian metapneumovirus vaccine.', *Avian Pathol* **33**(6), 576--580.

Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G. & Watson, R. (1993), 'Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.', *Biotechnology (N Y)* **11**(9), 1026--1030.

Hoffmann, B., Depner, K., Schirrmeier, H., Beer, M. (2006) 'A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses' *J Virol Methods* **136**, 200--209.

Huang, Y.; Wan, H. Q.; Liu, H. Q.; Wu, Y. T. & Liu, X. F. (2004), 'Genomic sequence of an isolate of Newcastle disease virus isolated from an outbreak in geese: a novel six nucleotide insertion in the non-coding region of the nucleoprotein gene. Brief Report.', *Arch Virol* **149**(7), 1445--1457.

Jarecki-Black, J. C. & King, D. J. (1993), 'An oligonucleotide probe that distinguishes isolates of low virulence from the more pathogenic strains of Newcastle disease virus.', *Avian Dis* **37**(3), 724--730.

Jestin, V. & Cherbonnel, M. (1991), 'Interferon-induction in mouse spleen cells by the Newcastle disease virus (NDV) HN protein.', *Ann Rech Vet* **22**(4), 365--372.

Jestin, V. & Jestin, A. (1991), 'Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification (PCR).', *Arch Virol* **118**(3-4), 151--161.

Johnston, P. A.; Liu, H.; O'Connell, T.; Phelps, P.; Bland, M.; Tyczkowski, J.; Kemper, A.; Harding, T.; Avakian, A.; Haddad, E.; Whitfill, C.; Gildersleeve, R. &

Ricks, C. A. (1997), 'Applications in in ovo technology.', *Poult Sci* **76**(1), 165--178.

Jung, R.; Soondrum, K. & Neumaier, M. (2000), 'Quantitative PCR.', *Clin Chem Lab Med* **38**(9), 833--836.

Kaleta, E. & Baldauf, C. (1988), *Newcastle Disease in free-living and pet birds*, Kluwer Academic Publisher, Boston, MA, pp. 197-246.

Kaleta, E. F.; Siegmann, O.; Jank-Ladwig, R. & Glünder, G. (1979), 'Isolation and biological properties of virulent subpopulations from lentogenic Newcastle disease virus strains.', *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **2**(4), 485--496.

Kant, A.; Koch, G.; Roozelaar, D. J. V.; Balk, F. & Huurne, A. T. (1997), 'Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction.', *Avian Pathol* **26**(4), 837--849.

Kapczynski, D. R. & King, D. J. (2005), 'Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak.', *Vaccine* **23**(26), 3424--3433.

Karaca, K.; Sharma, J. M.; Winslow, B. J.; Junker, D. E.; Reddy, S.; Cochran, M. & McMillen, J. (1998), 'Recombinant fowlpox viruses coexpressing chicken type I IFN and Newcastle disease virus HN and F genes: influence of IFN on protective efficacy and humoral responses of chickens following in ovo or post-hatch administration of recombinant viruses.', *Vaccine* **16**(16), 1496--1503.

Kawahara, N.; Yang, X. Z.; Sakaguchi, T.; Kiyotani, K.; Nagai, Y. & Yoshida, T. (1992), 'Distribution and substrate specificity of intracellular proteolytic processing enzyme(s) for paramyxovirus fusion glycoproteins.', *J Gen Virol* **73** (Pt 3), 583--590.

Kho, C. L.; Mohd-Azmi, M. L.; Arshad, S. S. & Yusoff, K. (2000), 'Performance of an RT-nested PCR ELISA for detection of Newcastle disease virus.', *J Virol Methods* **86**(1), 71--83.

Kim, L. M.; Afonso, C. L. & Suarez, D. L. (2006), 'Effect of probe-site mismatches on detection of virulent Newcastle disease viruses using a fusion-gene real-time reverse transcription polymerase chain reaction test.', *J Vet Diagn Invest* **18**(6), 519--528.

Kim, L. M.; King, D. J.; Curry, P. E.; Suarez, D. L.; Swayne, D. E.; Stallknecht, D. E.; Slemons, R. D.; Pedersen, J. C.; Senne, D. A.; Winker, K. & Afonso, C. L. (2007), 'Phylogenetic diversity among low-virulence newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates.', *J Virol* **81**(22), 12641--12653.

Kim, L. M.; King, D. J.; Suarez, D. L.; Wong, C. W. & Afonso, C. L. (2007), 'Characterization of class I Newcastle disease virus isolates from Hong Kong live bird markets and detection using real-time reverse transcription-PCR.', *J Clin Microbiol* **45**(4), 1310--1314.

Kinde, H.; Hullinger, P. J.; Charlton, B.; McFarland, M.; Hietala, S. K.; Velez, V.; Case, J. T.; Garber, L.; Wainwright, S. H.; Mikolon, A. B.; Breitmeyer, R. E. & Ardans, A. A. (2005), 'The isolation of exotic Newcastle disease (END) virus from nonpoultry avian species associated with the epidemic of END in chickens in southern California: 2002-2003.', *Avian Dis* **49**(2), 195--198.

King, D. J. (1996), 'Influence of chicken breed on pathogenicity evaluation of velogenic neurotropic Newcastle disease virus isolates from cormorants and turkeys.', *Avian Dis* **40**(1), 210--217.

King, D. J. (1993), 'Newcastle disease virus passage in MDBK cells as an aid in detection of a virulent subpopulation.', *Avian Dis* **37**(4), 961--969.

King, D. J. & Seal, B. S. (1997), 'Biological and molecular characterization of Newcastle disease virus isolates from surveillance of live bird markets in the northeastern United States.', *Avian Dis* **41**(3), 683--689.

Klenk, H. D.; Garten, W.; Kohama, T.; Huang, R. T. & Rott, R. (1980), 'Activation of myxovirus glycoproteins by post-translational proteolysis.', *Biochem Soc Trans* **8**(4), 419--422.

Knorr, H. L. & Weber, A. (1992), '[Ocular manifestations of selected zoonoses in humans]', *Tierarztl Prax* **20**(4), 347--354.

Kommers, G. D.; King, D. J.; Seal, B. S. & Brown, C. C. (2003), 'Pathogenesis of chicken-passaged Newcastle disease viruses isolated from chickens and wild and exotic birds.', *Avian Dis* **47**(2), 319--329.

Kong, L.; Ren, T.; Ao, Y.; Xi, R. & Liao, M. (2007), 'Multiplex RT-PCR for virulence detection and differentiation between Newcastle disease virus and goose-origin APVM-1.', *Avian Dis* **51**(3), 668--673.

Koshkin, A. (1998), 'LNA (locked nucleic acids): synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerization, and unprecedented nucleic acid recognition.', *Tetrahedron* **54**, 3607-3630.

Kraneveld, F. (1926), 'A Poultry Disease in the Dutch East Indies', *Netherlands Indisch Bladen von Diergeneeskunde* **38**, 448-450.

Krishnamurthy, S. & Samal, S. K. (1998), 'Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence.', *J Gen Virol* **79** (Pt **10**), 2419--2424.

Kuiken, T.; Heckert, R. A.; Riva, J.; Leighton, F. A. & Wobeser, G. (1998), 'Excretion of pathogenic Newcastle disease virus by double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) in absence of mortality or clinical signs of disease.', *Avian Pathol* **27**(6), 541--546.

Kuiken, T.; Wobeser, G.; Leighton, F. A.; Haines, D. M.; Chelack, B.; Bogdan, J.; Hassard, L.; Heckert, R. A. & Riva, J. (1999), 'Pathology of Newcastle disease in double-crested cormorants from Saskatchewan, with comparison of diagnostic methods.', *J Wildl Dis* **35**(1), 8--23.

Kutyavin, I.; Lokhov, S.; Lukhtanov, E. & Reed, M. W. (2003), 'Chemistry of minor groove binder-oligonucleotide conjugates.', *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* **Chapter 8**, Unit 8.4.

Kutyavin, I. V.; Afonina, I. A.; Mills, A.; Gorn, V. V.; Lukhtanov, E. A.; Belousov, E. S.; Singer, M. J.; Walburger, D. K.; Lokhov, S. G.; Gall, A. A.; Dempcy, R.; Reed, M. W.; Meyer, R. B. & Hedgpeth, J. (2000), '3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures.', *Nucleic Acids Res* **28**(2), 655-661.

Lam, K. M. (2003), 'Newcastle disease virus-induced damage to embryonic tracheae and red blood cells.', *Avian Dis* **47**(1), 197--202.

Lam, K. M. (1996), 'Newcastle disease virus-induced apoptosis in the peripheral blood mononuclear cells of chickens.', *J Comp Pathol* **114**(1), 63--71.

Lam, K. M. (1995), 'Apoptosis in chicken embryo fibroblasts caused by Newcastle disease virus.', *Vet Microbiol* **47**(3-4), 357--363.

Lamb, R.; Collins, P.; Kolakofsky, D.; Melero, J.; Nagai, Y.; Oldstone, M.; C.R., P. & Rima, B. (2005), *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses*, Elsevier Academic Press, chapter Paramyxoviridae.

Lancaster, J. (1977), 'Newcastle Disease - a review of the geographical incidence and epizootiology', *World's Poultry Science Journal* **33**, 155-165.

Lau, L. T.; Fung, Y. W. W. & Yu, A. C. H. (2006), 'Detection of animal viruses using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA).', *Dev Biol (Basel)* **126**, 7--15; discussion 323.

LeDourain, N.; Dieterlen-Lièvre, F. & Oliver, P. (1984), 'Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells', *Am. J Anat.* **170**, 261-299.

Lee, T. C.; Yusoff, K.; Nathan, S. & Tan, W. S. (2006), 'Detection of virulent Newcastle disease virus using a phage-capturing dot blot assay.', *J Virol Methods* **136**(1-2), 224--229.

de Leeuw, O. & Peeters, B. (1999), 'Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae.', *J Gen Virol* **80** (Pt 1), 131--136.

Leuwerke, B.; Kitikoon, P.; Evans, R. & Thacker, E. (2008), 'Comparison of three serological assays to determine the cross-reactivity of antibodies from eight genetically diverse U.S. Swine influenza viruses.', *J Vet Diagn Invest* **20**(4), 426--432.

Li, Y. P. & Zhang, M. F. (2004), 'Rapid pathotyping of Newcastle disease virus from allantoic fluid and organs of experimentally infected chickens using two novel probes.', *Arch Virol* **149**(6), 1231--1243.

LIPPMANN, O. (1952), 'Human conjunctivitis due to the Newcastle-disease virus of fowls.', *Am J Ophthalmol* **35**(7), 1021--1028.

Liu, Y. L.; Hu, S. L.; Zhang, Y. M.; Sun, S. J.; Romer-Oberdorfer, A.; Veits, J.; Wu, Y. T.; Wan, H. Q. & Liu, X. F. (2007), 'Generation of a velogenic Newcastle disease virus from cDNA and expression of the green fluorescent protein.', *Arch Virol* **152**(7), 1241--1249.

Locke, D. P.; Sellers, H. S.; Crawford, J. M.; Schultz-Cherry, S.; King, D. J.; Meinersmann, R. J. & Seal, B. S. (2000), 'Newcastle disease virus phosphoprotein gene analysis and transcriptional editing in avian cells.', *Virus Res* **69**(1), 55--68.

Lomniczi, B.; Meager, A. & Burke, D. C. (1971), 'Virus RNA and protein synthesis in cells infected with different strains of Newcastle disease virus.', *J Gen Virol* **13**(1), 111--120.

Mackay, I. M.; Arden, K. E. & Nitsche, A. (2002), 'Real-time PCR in virology.', *Nucleic Acids Res* **30**(6), 1292--1305.

Mast, J. & Goddeeris, B. M. (1999), 'Development of immunocompetence of broiler chickens.', *Vet Immunol Immunopathol* **70**(3-4), 245--256.

Mast, J.; Nanbru, C.; van den Berg, T. & Meulemans, G. (2005), 'Ultrastructural changes of the tracheal epithelium after vaccination of day-old chickens with the La Sota strain of Newcastle disease virus.', *Vet Pathol* **42**(5), 559--565.

Mast, J.; Nanbru, C.; Decaesstecker, M.; Lambrecht, B.; Couvreur, B.; Meulemans, G. & van den Berg, T. (2006), 'Vaccination of chicken embryos with escape mutants of La Sota Newcastle disease virus induces a protective immune response.', *Vaccine* **24**(11), 1756--1765.

McMillan, B. C. & Hanson, R. P. (1982), 'Differentiation of exotic strains of Newcastle disease virus by oligonucleotide fingerprinting.', *Avian Dis* **26**(2), 332--339.

Mebatsion, T.; de Vaan, L. T. C.; de Haas, N.; Römer-Oberdörfer, A. & Braber, M. (2003), 'Identification of a mutation in editing of defective Newcastle disease virus recombinants that modulates P-gene mRNA editing and restores virus replication and pathogenicity in chicken embryos.', *J Virol* **77**(17), 9259--9265.

Mebatsion, T.; Verstegen, S.; Vaan, L. T. D.; Römer-Oberdörfer, A. & Schrier, C. C. (2001), 'A recombinant newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos.', *J Virol* **75**(1), 420--428.

Mebatsion, T.; Versteegen, S.; Vaan, L. T. D.; Römer-Oberdörfer, A. & Schrier, C. C. (2001), 'A recombinant newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos.', *J Virol* **75**(1), 420--428.

Meteyer, C. U.; Docherty, D. E.; Glaser, L. C.; Franson, J. C.; Senne, D. A. & Duncan, R. (1997), 'Diagnostic findings in the 1992 epornitic of neurotropic velogenic Newcastle disease in double-crested cormorants from the upper midwestern United States.', *Avian Dis* **41**(1), 171--180.

Meulemans, G.; Gonze, M.; Carlier, M. C.; Petit, P.; Burny, A. & Long, L. (1987), 'Evaluation of the use of monoclonal antibodies to hemagglutinin and fusion glycoproteins of Newcastle disease virus for virus identification and strain differentiation purposes.', *Arch Virol* **92**(1-2), 55--62.

Meulemans, G.; Gonze, M.; Carlier, M. C.; Petit, P.; Burny, A. & Long, L. (1986), 'Antigenic and biological characterization of avian paramyxovirus type 1 isolates from pigeons.', *Arch Virol* **87**(3-4), 151--161.

Miller, P. J.; King, D. J.; Afonso, C. L. & Suarez, D. L. (2007), 'Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge.', *Vaccine* **25**(41), 7238--7246.

Miller, P. J.; King, D. J.; Afonso, C. L. & Suarez, D. L. (2007), 'Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge.', *Vaccine* **25**(41), 7238--7246.

Mohn, U. (2005), 'Charakterisierung von Papageien-Isolaten des Aviären Paramyxovirus Serotyp 1 (APMV-1) und Nachweis von nichtinfektiösen Paramyxovirus-Partikeln im Kot von subklinisch APMV-1 infizierten Psittaziden', PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Morrison, T.; McQuain, C. & McGinnes, L. (1991), 'Complementation between avirulent Newcastle disease virus and a fusion protein gene expressed from a retrovirus vector: requirements for membrane fusion.', *J Virol* **65**(2), 813--822.

Muramatsu, M. & Homma, M. (1980), 'Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. V. An activating enzyme for Sendai virus in the chorioallantoic fluid of the embryonated chicken egg.', *Microbiol Immunol* **24**(2), 113--122.

Nagai, Y.; Klenk, H. D. & Rott, R. (1976), 'Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus.', *Virology* **72**(2), 494--508.

Nagai, Y.; Shimokata, K.; Yoshida, T.; Hamaguchi, M.; Iinuma, M.; Maeno, K.; Matsumoto, T.; Klenk, H. D. & Rott, R. (1979), 'The spread of a pathogenic and an apathogenic strain of Newcastle disease virus in the chick embryo as depending on the protease sensitivity of the virus glycoproteins.', *J Gen Virol* **45**(2), 263--272.

Nagy, E.; Krell, P. J.; Dulac, G. C. & Derbyshire, J. B. (1991), 'Vaccination against Newcastle disease with a recombinant baculovirus hemagglutinin-neuraminidase subunit vaccine.', *Avian Dis* **35**(3), 585--590.

Nakamura, K.; Ueda, H.; Tanimura, T. & Noguchi, K. (1994), 'Effect of mixed live vaccine (Newcastle disease and infectious bronchitis) and *Mycoplasma gallisepticum* on the chicken respiratory tract and on *Escherichia coli* infection.', *J Comp Pathol* **111**(1), 33--42.

Negash, T.; al-Garib, S. O. & Gruys, E. (2004), 'Comparison of in ovo and post-hatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. A review.', *Vet Q* **26**(2), 76--87.

Nishio, M.; Tsurudome, M.; Ito, M. & Ito, Y. (2000), 'Mapping of domains on the human parainfluenza type 2 virus P and NP proteins that are involved in the interaction with the L protein.', *Virology* **273**(2), 241--247.

Organisation Internationale des Épizooties (2008), *O.I.E. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, O.I.E., chapter 2.3.14 Newcastle Disease.

Organisation Internationale des Épizooties (O.I.E.) World Animal Health Information Database (WAHID) Interface
<http://www.oie.int/wahid-prod/public.php?page=home>

Ogasawara, T.; Gotoh, B.; Suzuki, H.; Asaka, J.; Shimokata, K.; Rott, R. & Nagai, Y. (1992), 'Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo.', *EMBO J* **11**(2), 467--472.

Ojok, L. & Brown, C. (1996), 'An immunohistochemical study of the pathogenesis of virulent viscerotropic Newcastle disease in chickens.', *J Comp Pathol* **115**(3), 221--227.

Oldoni, I.; Brown, C. C.; King, D. J.; Samal, S. & Seal, B. S. (2005), 'The use of in situ hybridization and immunohistochemistry to study the pathogenesis of various Newcastle disease virus strains and recombinants in embryonated chicken eggs.', *Microb Pathog* **39**(3), 69--75.

de Oliveira Torres Carrasco, A.; Seki, M. C.; de Freitas Raso, T.; Paulillo, A. C. & Pinto, A. A. (2008), 'Experimental infection of Newcastle disease virus in pigeons (*Columba livia*): humoral antibody response, contact transmission and viral genome shedding.', *Vet Microbiol* **129**(1-2), 89--96.

Oláh, I. & Glick, B. (1984), 'Meckel's diverticulum. I. Extramedullary myelopoiesis in the yolk sac of hatched chickens (*Gallus domesticus*).', *Anat Rec* **208**(2), 243--252.

Oláh, I.; Glick, B. & Taylor, R. L. (1984), 'Meckel's diverticulum. II. A novel lymphoepithelial organ in the chicken.', *Anat Rec* **208**(2), 253--263.

Orum, H.; Jakobsen, M. H.; Koch, T.; Vuust, J. & Borre, M. B. (1999), 'Detection of the factor V Leiden mutation by direct allele-specific hybridization of PCR amplicons to photoimmobilized locked nucleic acids.', *Clin Chem* **45**(11), 1898--1905.

Palmieri, S. & Mitchell, B. W. (1991), 'Comparison of three velogenic strains of Newcastle disease virus by RNA oligonucleotide fingerprinting.', *Avian Dis* **35**(2), 384--388.

Panshin, A.; Shihmanter, E.; Weisman, Y.; Orvell, C.; Kydyrmanov, A.; Asanov, N.; Daulbaeva, K.; Sayatov, M. & Lipkind, M. (2000), 'Antigenic characterization of the nucleocapsid protein of Newcastle disease virus by means of a new panel of monoclonal antibodies.', *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **23**(3), 209--220.

Pearson, J. E.; Senne, D. A.; Carbrev, E. A.; Erickson, G. A. & Miller, L. D. (1975), 'Viral isolations from exotic birds offered for importation into the United States.', *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc*(79), 219--223.

Pedersen, J. C.; Senne, D. A.; Woolcock, P. R.; Kinde, H.; King, D. J.; Wise, M. G.; Panigrahy, B. & Seal, B. S. (2004), 'Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America.', *J Clin Microbiol* **42**(5), 2329--2334.

Peebles, M. (1988), *Newcastle Disease*, Kluwer Academic Publisher, Boston, MA, chapter Newcastle Disease Virus Replication, pp. 45-73.

Peeters, B. P.; Gruijthuijsen, Y. K.; de Leeuw, O. S. & Gielkens, A. L. (2000), 'Genome replication of Newcastle disease virus: involvement of the rule-of-six.', *Arch Virol* **145**(9), 1829--1845.

Peeters, B. P.; de Leeuw, O. S.; Koch, G. & Gielkens, A. L. (1999), 'Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence.', *J Virol* **73**(6), 5001--5009.

Perozo, F.; Villegas, P. & Afonso, C. (2008), 'Genomic comparison of the complete coding and intergenic regions of the VG/GA Newcastle disease virus and its respirotropic clone 5.', *Virus Genes*.

- Perozo, F.; Villegas, P.; Estevez, C.; Alvarado, I. R.; Purvis, L. B. & Saume, E. (2008), 'Avian adeno-associated virus-based expression of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein for poultry vaccination.', *Avian Dis* **52**(2), 253--259.
- Petersen, M.; Nielsen, J. T.; Bondensgaard, K.; Wengel, J. & Jacobsen, J. P. (2003), 'Structural characterization of LNA and alpha-L-LNA hybridized to RNA.', *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **22**(5-8), 1691--1693.
- Petersen, M. & Wengel, J. (2003), 'LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics.', *Trends Biotechnol* **21**(2), 74--81.
- Pham, H. M.; Chang, K. S.; Mase, M.; Ohashi, K. & Onuma, M. (2004), 'Molecular characterization of the nucleocapsid protein gene of Newcastle disease virus strains in Japan and development of a restriction enzyme-based rapid identifying method.', *Arch Virol* **149**(8), 1559--1569.
- Pham, H. M.; Nakajima, C.; Ohashi, K. & Onuma, M. (2005), 'Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus.', *J Clin Microbiol* **43**(4), 1646--1650.
- Phillips, R. J.; Samson, A. C. & Emmerson, P. T. (1998), 'Nucleotide sequence of the 5'-terminus of Newcastle disease virus and assembly of the complete genomic sequence: agreement with the "rule of six".', *Arch Virol* **143**(10), 1993--2002.
- Piela, T. H.; Gulka, C. M.; Yates, V. J. & Chang, P. W. (1984), 'Use of egg yolk in serological tests (ELISA and HI) to detect antibody to Newcastle disease, infectious bronchitis, and Mycoplasma gallisepticum.', *Avian Dis* **28**(4), 877--883.
- Pospisil, Z.; Zendulkova, D. & Smid, B. (1991), 'Unexpected emergence of Newcastle Disease Virus in very young chicks', *Acta Vet Brno* **60**, 263-270.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Rautenschlein, S.; Sharma, J. M.; Winslow, B. J.; McMillen, J.; Junker, D. & Cochran, M. (1999), 'Embryo vaccination of turkeys against Newcastle disease infection with recombinant fowlpox virus constructs containing interferons as adjuvants.', *Vaccine* **18**(5-6), 426--433.
- Reed, L. & Muench, H. (1938), 'Simple Method of estimating 50 percent endpoints', *Am J Hyg* **27**, 493-497.
- Reynolds, D. L. & Maraqa, A. D. (2000), 'Protective immunity against Newcastle disease: the role of cell-mediated immunity.', *Avian Dis* **44**(1), 145--154.
- Rima, B. K. & Duprex, W. P. (2005), 'Molecular mechanisms of measles virus persistence.', *Virus Res* **111**(2), 132--147.
- Rodriguez-Sanchez, B.; Sanchez-Vizcaino, J. M.; Uttenthal, A.; Rasmussen, T. B.; Hakhverdyan, M.; King, D. P.; Ferris, N. P.; Ebert, K.; Reid, S. M.; Kiss, I.; Brocchi, E.; Cordioli, P.; Hjerner, B.; McMenamy, M.; McKillen, J.; Ahmed, J. S. & Belak, S. (2008), 'Improved diagnosis for nine viral diseases considered as notifiable by the world organization for animal health.', *Transbound Emerg Dis* **55**(5-6), 215--225.
- Rott, R. (1979), 'Molecular basis of infectivity and pathogenicity of myxovirus. Brief review.', *Arch Virol* **59**(4), 285--298.
- Rout, S. N. & Samal, S. K. (2008), 'The large polymerase protein is associated with the virulence of Newcastle disease virus.', *J Virol* **82**(16), 7828--7836.
- Römer-Oberdörfer, A.; Mundt, E.; Mebatsion, T.; Buchholz, U. J. & Mettenleiter, T. C. (1999), 'Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA.', *J Gen Virol* **80** (Pt 11), 2987--2995.
- Römer-Oberdörfer, A.; Veits, J.; Werner, O. & Mettenleiter, T. C. (2006), 'Enhancement of pathogenicity of Newcastle disease virus by alteration of specific amino acid residues in the surface glycoproteins F and HN.', *Avian Dis* **50**(2), 259--263.

Römer-Oberdörfer, A.; Werner, O.; Veits, J.; Mebatsion, T. & Mettenleiter, T. C. (2003), 'Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity.', *J Gen Virol* **84**(Pt 11), 3121--3129.

Sakaguchi, T.; Matsuda, Y.; Kiyokage, R.; Kawahara, N.; Kiyotani, K.; Katunuma, N.; Nagai, Y. & Yoshida, T. (1991), 'Identification of endoprotease activity in the trans Golgi membranes of rat liver cells that specifically processes in vitro the fusion glycoprotein precursor of virulent Newcastle disease virus.', *Virology* **184**(2), 504--512.

Salih, O.; Omar, A.; Ali, A. & Yusoff, K. (2000), 'Nucleotide sequence analysis of the F protein gene of a Malaysian velogenic NDV strain AF2240', *Journal of Molecular Biology, Biochemistry & Biophysics* **4**, 51-57.

Sambrook, J.; Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning. A laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schwarze, E. (1979), *Kompendium der Geflügelanatomie*, Fischer, Stuttgart.

Seal, B. S. (2004), 'Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogenetic relationships among the Paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences.', *Funct Integr Genomics* **4**(4), 246--257.

Seal, B. S. (1995), 'Analysis of matrix protein gene nucleotide sequence diversity among Newcastle disease virus isolates demonstrates that recent disease outbreaks are caused by viruses of psittacine origin.', *Virus Genes* **11**(2-3), 217--224.

Seal, B. S.; Crawford, J. M.; Sellers, H. S.; Locke, D. P. & King, D. J. (2002), 'Nucleotide sequence analysis of the Newcastle disease virus nucleocapsid protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae.', *Virus Res* **83**(1-2), 119--129.

Seal, B. S.; King, D. J. & Bennett, J. D. (1996), 'Characterization of Newcastle disease virus vaccines by biological properties and sequence analysis of the hemagglutinin-neuraminidase protein gene.', *Vaccine* **14**(8), 761--766.

Seal, B. S.; King, D. J. & Bennett, J. D. (1995), 'Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis.', *J Clin Microbiol* **33**(10), 2624--2630.

Seal, B. S.; Wise, M. G.; Pedersen, J. C.; Senne, D. A.; Alvarez, R.; Scott, M. S.; King, D. J.; Yu, Q. & Kapczynski, D. R. (2005), 'Genomic sequences of low-virulence avian paramyxovirus-1 (Newcastle disease virus) isolates obtained from live-bird markets in North America not related to commonly utilized commercial vaccine strains.', *Vet Microbiol* **106**(1-2), 7--16.

Sharma, J. M. & Burmester, B. R. (1982), 'Resistance to Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus.', *Avian Dis* **26**(1), 134--149.

Sharma, J. M.; Zhang, Y.; Jensen, D.; Rautenschlein, S. & Yeh, H. Y. (2002), 'Field trial in commercial broilers with a multivalent in ovo vaccine comprising a mixture of live viral vaccines against Marek's disease, infectious bursal disease, Newcastle disease, and fowl pox.', *Avian Dis* **46**(3), 613--622.

Singh, S. (1998), 'LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition', *Chem Commun*, 455-456.

Spalatin, J.; Hanson, R. P. & Beard, P. D. (1970), 'The hemagglutination-elution pattern as a marker in characterizing Newcastle disease virus.', *Avian Dis* **14**(3), 542-549.

Steel, J.; Burmakina, S. V.; Thomas, C.; Spackman, E.; García-Sastre, A.; Swayne, D. E. & Palese, P. (2008), 'A combination in-ovo vaccine for avian influenza virus and Newcastle disease virus.', *Vaccine* **26**(4), 522--531.

Steel, J.; Burmakina, S. V.; Thomas, C.; Spackman, E.; García-Sastre, A.; Swayne, D. E. & Palese, P. (2008), 'A combination in-ovo vaccine for avian influenza virus and Newcastle disease virus.', *Vaccine* **26**(4), 522--531.

Steinhauer, D. A. (1999), 'Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus.', *Virology* **258**(1), 1--20.

Stettler, M.; Beck, K.; Wagner, A.; Vandeveld, M. & Zurbriggen, A. (1997), 'Determinants of persistence in canine distemper viruses.', *Vet Microbiol* **57**(1), 83--93.

Steward, M.; Vipond, I. B.; Millar, N. S. & Emmerson, P. T. (1993), 'RNA editing in Newcastle disease virus.', *J Gen Virol* **74** (Pt 12), 2539--2547.

Stone, H. D. (1989), 'Efficacy of oil-emulsion vaccines prepared with pigeon paramyxovirus-1, Ulster, and La Sota Newcastle disease viruses.', *Avian Dis* **33**(1), 157--162.

Stone-Hulslander, J. & Morrison, T. G. (1997), 'Detection of an interaction between the HN and F proteins in Newcastle disease virus-infected cells.', *J Virol* **71**(9), 6287--6295.

Takimoto, T. & Portner, A. (2004), 'Molecular mechanism of paramyxovirus budding.', *Virus Res* **106**(2), 133--145.

Tan, S. W.; Omar, A. R.; Aini, I.; Yusoff, K. & Tan, W. S. (2004), 'Detection of Newcastle disease virus using a SYBR Green I real time polymerase chain reaction.', *Acta Virol* **48**(1), 23--28.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007), 'MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.' *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596--1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)

Tarpey, I. & Huggins, M. B. (2007), 'Onset of immunity following in ovo delivery of avian metapneumovirus vaccines.', *Vet Microbiol* **124**(1-2), 134--139.

Tashiro, M.; Seto, J. T.; Choosakul, S.; Hegemann, H.; Klenk, H. D. & Rott, R. (1992), 'Changes in specific cleavability of the Sendai virus fusion protein: implications for pathogenicity in mice.', *J Gen Virol* **73** (Pt 6), 1575--1579.

Tierseuchengesetz in der Fassung der Bekanntmachung von 22. Juni 2004 (BGBl. I S.

1260; 3588), zuletzt geändert durch Artikel 1 § 5 Abs. 3 des Gesetzes vom 13. Dezember 2007 (BGBl. I S. 2930)

Tiwari, A. K.; Kataria, R. S.; Nanthakumar, T.; Dash, B. B. & Desai, G. (2004), 'Differential detection of Newcastle disease virus strains by degenerate primers based RT-PCR.', *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **27**(3), 163--169.

Toyoda, T.; Hamaguchi, M. & Nagai, Y. (1987), 'Detection of polycistronic transcripts in Newcastle disease virus infected cells and identification of their sequence content.', *Arch Virol* **95**(1-2), 97--110.

Toyoda, T.; Sakaguchi, T.; Hirota, H.; Gotoh, B.; Kuma, K.; Miyata, T. & Nagai, Y. (1989), 'Newcastle disease virus evolution. II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains.', *Virology* **169**(2), 273--282.

Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpes (Geflügelpest-Verordnung) vom 18. Oktober 2007 (BGBl. I S. 2348)

Verordnung über Sera, Impfstoffe und Antigene nach dem Tierseuchengesetz (TierimpfstoffVO) vom 24. Oktober 2006 (BGBl. I S. 49)

Wakamatsu, N.; King, D. J.; Seal, B. S.; Peeters, B. P. H. & Brown, C. C. (2006), 'The effect on pathogenesis of Newcastle disease virus LaSota strain from a mutation of the fusion cleavage site to a virulent sequence.', *Avian Dis* **50**(4), 483--488.

Wakenell, P. S. & Sharma, J. M. (1986), 'Chicken embryonal vaccination with avian infectious bronchitis virus.', *Am J Vet Res* **47**(4), 933--938.

Wambura, P.; Meers, J. & Spradbrow, P. (2006), 'Determination of organ tropism of Newcastle disease virus (strain I-2) by virus isolation and reverse transcription-polymerase chain reaction.', *Vet Res Commun* **30**(6), 697--706.

Wang, C.; Hsu, C.; Chen, H.; Chulu, J. L. C. & Liu, H. (2008), 'Development of a reliable assay protocol for identification of diseases (RAPID)-bioactive amplification with probing (BAP) for detection of Newcastle disease virus.', *Vet Microbiol* **130**(1-2), 28--36.

Wang, Z.; Vreede, F. T.; Mitchell, J. O. & Viljoen, G. J. (2001), 'Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus isolates by a triple one-step RT-PCR.', *Onderstepoort J Vet Res* **68**(2), 131--134.

Werner, O.; Römer-Oberdörfer, A.; Köllner, B.; Manvell, R. J. & Alexander, D. J. (1999), 'Characterization of avian paramyxovirus type 1 strains isolated in Germany during 1992 to 1996.', *Avian Pathol* **28**(1), 79--88.

Wilde, A.; McQuain, C. & Morrison, T. (1986), 'Identification of the sequence content of four polycistronic transcripts synthesized in Newcastle disease virus infected cells.', *Virus Res* **5**(1), 77--95.

Wise, M. G.; Suarez, D. L.; Seal, B. S.; Pedersen, J. C.; Senne, D. A.; King, D. J.; Kapczynski, D. R. & Spackman, E. (2004), 'Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of newcastle disease virus RNA in clinical samples.', *J Clin Microbiol* **42**(1), 329--338.

de Wit, J. J.; Davelaar, F. G. & Braunius, W. W. (1992), 'Comparison of the enzyme linked immunosorbent assay, the haemagglutination inhibition test and the agar gel precipitation test for the detection of antibodies against infectious bronchitis and Newcastle disease in commercial broilers.', *Avian Pathol* **21**(4), 651--658.

Yeh, H.; Rautenschlein, S. & Sharma, J. M. (2002), 'Protective immunity against infectious bursal disease virus in chickens in the absence of virus-specific antibodies.', *Vet Immunol Immunopathol* **89**(3-4), 149--158.

Yusoff, K., T. S. W. (2001), 'Newcastle Disease virus: macromolecules and opportunities', *Avian Pathology* **30**, 439-455.

Zhang, Y. & Sharma, J. M. (2003), 'Immunological tolerance in chickens hatching from eggs injected with cell-associated herpesvirus of Turkey (HVT).', *Dev Comp Immunol* **27**(5), 431--438.

9. Anhang

9.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Anzahl der von Newcastle Disease Ausbrüchen betroffenen Länder weltweit in den Jahren 2005, 2006 und 2007

Tab. 2 Von Newcastle Disease betroffenen europäische Länder in den Jahren 2005, 2006 und 2007

Tab. 3 Intracerebraler Pathogenitätsindex und Pathogenität im Hühnerei der schwachvirulenten Papageienisolate (modifiziert nach GRUND et al, 2002)

Tab. 4 Molekularbiologische diagnostische Assays zum Nachweis von Newcastle Disease, veröffentlicht seit 2001.

Tab. 5 Empfohlenes Impfschema für Newcastle Disease Virus

Tab. 6 Komponenten des Mastermix (modifiziert nach WISE et al, 2004)

Tab. 7 Temperaturprofil der NP RRT-PCR Reaktion nach WISE et al, 2004

Tab. 8 Eingesetzte Komponenten des Mastermix für die NP-PCR

Tab. 9 Temperaturprofil der RRT-PCR auf dem NP-Proteingen

Tab. 10 Finale Auswahl der Primer und Sonde

Tab. 11 Eingesetzte Komponenten des Mastermix für die NP-PCR

Tab. 12 Temperaturprofil der RRT-PCR

Tab. 13 Semiquantitative Wertung der PCR Ergebnisse

Tab. 14 Eingesetzte monoklonale Antikörper zur Detektierung der Lymphozytenfraktionen

Tab. 15 Amplifikation eines spezifischen Fragments des NP-Proteingens mit den sieben untersuchten Primerkombinationen.

Tab. 16 cT Werte bei jeweils gleichbleibender Primer- oder Sondenkonzentration.

Tab. 17 Vergleichende Detektion vier repräsentativer Stämme mit beiden für den Tierversuch angewandten RRT-PCR Protokollen.

Tab. 18 Schlupfraten und Infektionsraten der mit absteigenden Beimpfungsdosen beimpften 18-tägigen Hühnereier.

Tab. 19 Infektions-, Schlupf- und Überlebensrate der verschiedenen Versuchsgruppen.

Tab. 20 Mittels RRT-PCR positiv beprobte Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten, anteilig an der Gesamtzahl beprobter Tiere..

Tab. 21 RRT-PCR Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Virusausscheidung des Impfvirus vor und nach Belastungsinfektion.

Tab. 22 Serologische Ergebnisse der Versuchs-, Sentinel- und Kontrollgruppen über den gesamten Versuchszeitraum.

9.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Aufbau des Newcastle Disease Virus Genoms und dessen mono- und polycistronischen Transkriptionsprodukten.
- Abb. 2** Typisierung von Stämmen des aviären Paramyxovirus vom Serotyp 1.
- Abb. 3** In ovo Pathogenität der isolierten Papageienstämme
- Abb. 4** Schema der Versuchstiergruppen sowie Zeitpunkt des Viruskontaktes.
- Abb. 5** Schematische Darstellung der Probennahme aus den drei unterschiedlichen Hühnergruppen.
- Abb. 6** Kurvenverlauf vergleichend mit TaqMan und LNA Sonde
- Abb. 7** Ermittlung der optimalen Primer- und Sondenkonzentration.
- Abb. 8** Entwicklung der Tierzahlen der verschiedenen Gruppen während der ersten zehn Lebenstage.
- Abb. 9** Entwicklung der Tierzahlen über die gesamte Versuchsdauer.
- Abb. 10** Klinische Symptomatik der ungeimpften Kontrolltiere am Tag 2 post Challenge (23. Lebenstag).
- Abb. 11** Klinische Symptomatik des am fünften Tag post Challenge moribund aufgefundenen Sentineltieres.
- Abb. 12** Pathologisch-anatomische Befunde der 13 Tage nach Belastungsinfektion untersuchten Tiere der geimpften Versuchsgruppe.
- Abb. 13** Gewichtsentwicklung der Versuchs-, Sentinel- und Kontrollgruppen an den Lebenstagen 21 und 34.
- Abb. 14** Verteilung der viralen RNA in den untersuchten Organsystemen der Versuchsgruppe vor und nach der Belastungsinfektion.
- Abb. 15** Verteilung der viralen RNA in den untersuchten Organsystemen der ungeimpften Kontrollgruppe vor (Lebenstag 21) und nach (Lebenstag 23) der Belastungsinfektion.
- Abb. 16** Verlauf der Serumantwort im Hämagglutinationshemmungstest.
- Abb. 17** Verlaufs der Serumantwort im kommerziellen ELISA.
- Abb. 18** Western Blot Ergebnisse der an Tag 14 beprobten Tiere
- Abb. 19** Entwicklung der zellulären Immunantwort nach der Belastungsinfektion.

Abkürzungen

α -	anti
AF	Allantoisflüssigkeit
APMV	aviäres Paramyxovirus
APMV-1	aviäres Paramyxovirus vom Serotyp 1
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BHK	Baby Hamster Kidney
BHQ	Black hole quencher
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CAM	Chorioallantoismembran
cT	cycle Threshold
DNA	Deoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EID ₅₀	eiinfektiöse Dosis 50
ELD ₅₀	eilethale Dosis 50
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (enzymverstärkter Immunassay)
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
EEC	European Economic Community
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie)
FAM	6-Carboxyfluorescein
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
G	Gramm
GALT	gut associated lymphoid tissue / gastrointestinaltrakt-assoziiertes Lymphgewebe
GFP	green fluorescent protein
ICPI	intracerebraler Pathogenitätsindex
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G

IgA	Immunglobulin A
IgM	Immunglobulin M
H+L	heavy + light (leichte und schwere Immunglobulinketten)
HEX	6-carboxy-hexachlorofluorescein
LAMP	loop mediated isothermal amplification / isotherme Amplifikation
mAk	monoklonaler Antikörper
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
NDV	Newcastle Disease Virus
O.I.E.	Organisation Internationale des Épizooties
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
r/s	rounds per second
RSB	RNA Stabilizing Buffer
RT-PCR	reverse transcription PCR
RRT-PCR	real time RT-PCR
RT-LAMP	reverse transcription loop-mediated isothermal amplification
sec	Sekunde
TAMRA	6-carboxy-tetramethylrhodamine
TBE	Tris Base EDTA
TE	Tris EDTA
T _M	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WB	Western Blot

Aminosäure- und Nukleotidbezeichnungen wurden nach den Richtlinien der International Union of Biochemistry (IUB) abgekürzt

10. Lebenslauf

Name	Regula Christina Wäckerlin
Geburtsdatum	13. Juli 1980
Geburtsort	Burgdorf, BE, Schweiz
Staatsangehörigkeit	Schweizerin
Eltern	Erich Wäckerlin, europäischer Beamter Katharina Wäckerlin-Swiagenin, VHS-Dozentin
Familienstand	ledig
Schul Ausbildung	1986-1991 Grundschule Europäische Schule München 1991-1998 Gymnasium, Europäische Schule München
Hochschulausbildung	1998-1999 Studium der „Biological Sciences“ an der University of Alberta, Edmonton, Alberta, Kanada 1999-2005 Studium der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
Approbation	März 2005
Dissertation	April 2005 bis August 2006: Klinik für Vögel, Ludwig-Maximilians-Universität München September 2006 bis Oktober 2008: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems
Derzeitige Tätigkeit	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Virusdiagnostik, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems

11. Danksagung

Ein besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Ch. Grund für die Überlassung des Themas, die schöne Zeit an der Klinik für Vögel, München, die Ermöglichung des Umzugs auf die Insel Riems und seine anhaltende Unterstützung und unendliche Geduld bei der Erstellung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. M. Beer und Herrn Prof. Dr. Th. Mettenleiter danke ich für die Möglichkeit der Fertigstellung der Arbeit auf der Insel Riems und den unkomplizierten Umzug.

Den Doktoranden, Doktorandinnen und Post Doc Wissenschaftlern der Klinik für Vögel, München, und des Friedrich-Loeffler-Instituts, insbesondere Iris Daum, Beate Köhler, Dr. Miriam Rudolf, Tobias Letzel und Dr. Alexander Postel danke ich für das exzellente Arbeitsklima und die vielen anregenden Unterhaltungen.

Den technischen Assistentinnen Cornelia Illing, Bianka Hillmann, Julia Feldmann und Jenny Hagemann danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, ihr Engagement und ihre gute Laune.

Für die Unterstützung bei der Entwicklung und Auswertung der molekularen Methoden geht ein besonderer Dank an Dr. Bernd Hoffmann.

Für die Unterstützung bei der automatisierten RNA-Extraktion danke ich Dr. Markus Durban und Christian Korthase.

Ein Dank für die gute Organisation und Führung der L3 Infektionsstallungen und des Quarantänestalls gebührt Dr. Elke Lange sowie den Tierpflegern Kathrin Gellert, Jan Spaller, Roland Brill und André Bombowsky.

Für die Hilfe bei der Pathologie danke ich Prof. Dr. Jens Teifke und Joachim Meyer.

Für die Hilfe bei den FACS Analysen danke ich Dr. Ulrike Blohm und Stefanie Knöfel.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten möchte ich Dr. Mario Ziller vom FLI in Wusterhausen danken.

DANKSAGUNG

Bei den Damen und Herren auf dem Verwaltungsgang, insbesondere Ines Jakobi möchte ich mich für die moralische Unterstützung während des Schreibens bedanken.

Für die nicht immer reibungsfreie, aber immer gute Freundschaft und die vielen Abende in München, Oberschleissheim und in unserer Küche gilt Inge Müller ein besonderer Dank.

Schönen Dank an Babur für das Teilen von sechs Jahren meiner Biographie und das Relativieren vieler Dinge, die einem in Momenten wichtig scheinen.

Meinen Brüdern Urs und Michael danke ich für die Gewissheit, dass sie da sind wenn es wirklich nötig ist und das spontane Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Eltern kann ich nicht genug für ihr Liebe, ihre Unterstützung und ihren Rückhalt während der Fertigstellung dieser Arbeit und der gesamten Zeit davor danken.